



Mafalda Quintino do Nascimento Costa

Licenciatura em Ciências de Engenharia Biomédica

DESENVOLVIMENTO DE MICROFLUÍDICA EM PAPEL PARA UTILIZAÇÃO EM BIOSSENSORES

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Biomédica

Orientador: Elvira Maria Correia Fortunato, Prof. Doutora, FCT-UNL

Co-orientador: João José Inácio Silva, Doutor, INIAV

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Mário António Basto Forjaz Secca

Arguente(s): Prof. Doutor Hugo Manuel Brito Águas

Vogais: Prof. Doutora Elvira Maria Correia Fortunato

Doutor João José Inácio Silva



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Novembro 2012

Desenvolvimento de Microfluídica em Papel para Utilização em Biossensores

Orientadora: Prof. Doutora Elvira Fortunato

Co-orientador: Doutor João Inácio

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Biomédica

Departamento de Física
Faculdade de Ciências e Tecnologia
Universidade Nova de Lisboa

Novembro de 2012

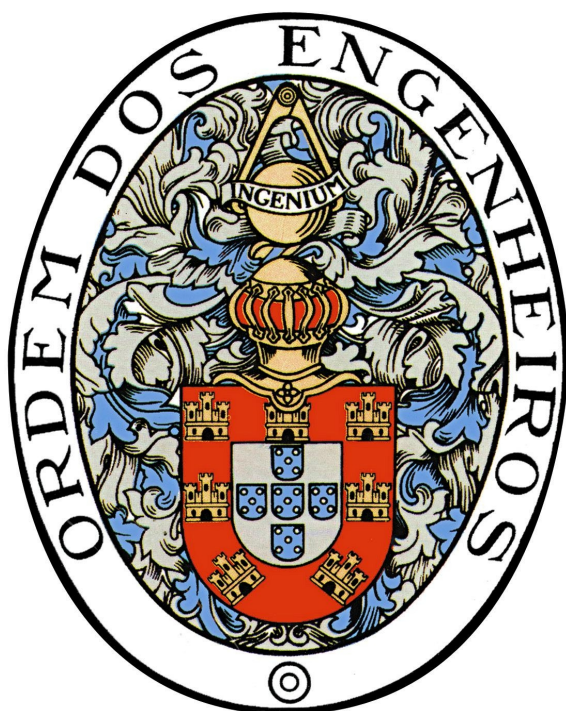
Desenvolvimento de Microfluídica em Papel para Utilização em Biossensores

Copyright © 2012 – Todos os direitos reservados. Mafalda Quintino do Nascimento Costa.
Faculdade de Ciências e Tecnologia. Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.



**Este trabalho foi realizado no âmbito do Projeto Lab-on-Paper,
contemplado com o Prémio Green Project Awards Portugal 2012,
na categoria de Investigação e Desenvolvimento**



A presente dissertação foi distinguida com o Prémio da Ordem dos Engenheiros, atribuído pela Sociedade Portuguesa dos Materiais no Dia Mundial dos Materiais 2012.

Dedicado à memória de Manuel do Nascimento Costa
Muito obrigada pelo carinho, amor e orgulho que sempre teve por mim.

Agradecimentos

É com enorme prazer e satisfação que termino esta importante etapa da minha vida.

Este trabalho foi realizado no âmbito do projeto Lab-on-Paper desenvolvido no Centro de Investigação de Materiais (CENIMAT) da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa.

Tive o imenso privilégio e orgulho de me envolver neste projeto com os meus orientadores, Professora Elvira Fortunato e Doutor João Inácio. Muito obrigada pela transmissão de conhecimentos, disponibilidade e sugestões.

O trabalho de investigação científica é necessariamente um trabalho de equipa e nesse sentido gostaria de agradecer aos meus colegas Jorge e David, que trabalharam comigo no desenvolvimento deste projeto.

Agradeço a disponibilidade quer dos equipamentos quer dos laboratórios, mas principalmente de todos os colegas que me apoiaram e auxiliaram.

Agradeço aos meus pais e irmão pelo apoio e amor incondicional.

Por último agradeço aos meus amigos. Sobretudo, agradeço à Sofia, por ao longo destes anos ter sido a irmã, a mãe e a amiga confidente quando mais precisava.

Resumo

Um fator importante para a prevenção e tratamento de doenças é um diagnóstico preciso e precoce. A Organização Mundial de Saúde estabeleceu diretivas para o desenvolvimento de testes de diagnóstico para utilização em regiões economicamente desfavorecidas, conhecidas sob o acrónimo ASSURED (Affordable, Sensitive, Specific, User-friendly, Rapid and Robust, Equipment-free and Delivered to those in need).

O objectivo deste projeto foi desenvolver biossensores com estas características explorando a tecnologia recente da microfluídica em papel. Vários tipos de papel foram estudados de modo a escolher o que apresentasse as características que potenciassessem o funcionamento dos dispositivos. Foi escolhido o papel de cromatografia Whatman nº1 por ser constituído maioritariamente por fibras de celulose e por ser bastante poroso e hidrófilo.

Os dispositivos baseiam-se na fabricação de microcanais em papel hidrófilo, delimitados por barreiras constituídas por cera hidrófoba. Os padrões foram impressos a cera na superfície do papel através de uma impressora comercial, e posteriormente difundidos a baixa temperatura por toda a sua espessura. Verificou-se que era possível criar barreiras hidrófobas a partir de linhas de largura nominal 200 μm , com um processo de difusão a 120 °C durante dois minutos, e que a largura mínima do canal criado no papel é de aproximadamente 500 μm .

Constatou-se que soluções aquosas em contacto com estes microcanais são conduzidas por capilaridade através das zonas predefinidas, permitindo assim controlar as soluções. Após deposição simples das biomoléculas nas zonas de teste e controlo, a detecção das reações de bioreconhecimento é identificada por uma alteração de cor.

Os dispositivos desenvolvidos foram implementados para determinar a concentração de glucose em soluções, para o diagnóstico de leishmaniose canina e de tuberculose.

Abstract

An important factor in the prevention and treatment of diseases is a precise and premature diagnostic. The World Health Organization established guidelines for developing of diagnostic tests adequate for resource-poor settings and regions, which are summarized under the acronym ASSURED (Affordable, Sensitive, Specific, User-friendly, Rapid and Robust, Equipment-free and Delivered to those in need).

The main goal of this project was to develop biosensors with these characteristics by exploring the promising but recent technology of paper-based microfluidics. Several types of paper were study in order to choose the one that can improve the devices properties. In the end Whatman n°1 chromatography paper was selected because of its high cellulose content, high porosity and hydrophilic properties.

The devices are based in the construction of microchannels in hydrophilic paper, delimited by barriers made of hydrophobic wax. The patterns are printed with a solid ink printer in the paper surface and then the wax is melted into the paper at low temperature. It was possible to create an hydrophobic barrier from lines with nominal width of 200 μm , using a melting temperature of 120 $^{\circ}\text{C}$ for two minutes. The minimum paper channel width achieved was 500 μm .

Capillary forces pull the liquid along the channels making it possible to control the flow of solutions into specific zones. After deposition of the biomolecules in the test and control lines, the detection can be identified by a color change.

The devices were developed in order to determine the glucose concentration in solutions and for the diagnostic of canine leishmaniasis and tuberculosis.

Lista de Acrónimos

ADN - Ácido Desoxirribonucleico

AKD - *Alkyl Ketene Dimer*

ARN / RNA - Ácido Ribonucleico / *Ribonucleic Acid*

ASSURED - *Affordable, Sensitive, Specific, User-friendly, Rapid and Robust, Equipment-free and Delivered to those in need.*

ATR - *Attenuated Total Reflection*

AuNPs - Nanopartículas de ouro

CENIMAT - Centro de Investigação de Materiais

CIGMH - Centro de Investigação em Genética Molecular Humana

CRT - *Cathode Ray Tube*

DAT - *Direct Agglutination Test*

dNTP - nucleótidos

DRX - Difração de Raios X

DSC - *Differential Scanning Calorimetry*

DTA - *Differential Thermal Analysis*

EDS - *Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy*

ELISA - *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*

EQ - Detecção Química

EQL - Detecção Electroquimioluminescente

FCT - Faculdade de Ciências e Tecnologia

FRX - Fluorescência de Raios X

FTIR - *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*

HIV - *Human Immunodeficiency Virus*

ICT - *Immunochromatographic Test*

IH CH - Impressão Horizontal Corte Horizontal

IH CV - Impressão Horizontal Corte Vertical

IV CH - Impressão Vertical Corte Horizontal

IV CV - Impressão Vertical Corte Vertical

LFA - *Lateral Flow Assay*

LNIV - Laboratório Nacional de Investigação Veterinária

Mtb - *Mycobacterium tuberculosis*

MTBC - *Mycobacterium tuberculosis Complex*

OMS - Organização Mundial de Saúde

PBS - *Phosphate Buffer Saline*

PCR - *Polymerase Chain Reaction*

PDMS - Polimetilsiloxano/*Polydimethylsiloxane*

POC - *Point-of-Care*

QL - Detecção Quimioluminescente
rpoB - Subunidade β da polimerase de RNA
SEM-FIB - *Scanning Electron Microscopy*
SPR - *Surface Plasmon Ressonance*
TA - *Thermal Analysis*
TB - Tuberculose
TG - Termogravimetria
UNL - Universidade Nova de Lisboa
USA - *United States of America*
UV - Ultra Violeta
VL - *Visceral Leishmaniasis*

Lista de Símbolos

µg - Micrograma

Al - Alumínio

C - Carbono

Ca - Cálcio

CaCO₃ - Carbonato de Cálcio

Cl - Cloro

cm - Centímetro

Cu - Cobre

D - Diâmetro médio do poro

d - difusão lateral

d_{hkl} - Distância

dL - decilitro

E - Energia

H₂O - Água

I₀ - Intensidade do feixe Incidente

I₀₀₂ - Intensidade no plano cristalográfico (002)

I_{am} - Intensidade na zona amorfa

ICr - Índice de Cristalinidade

I_t - Intensidade transmitida

J - Joule

KCl - Cloreto de Potássio

keV - Kilo Eletrão

kg - Kilograma

L - Largura da barreira (frente)

L₀ - Distância mínima entre barreiras

L_c - Largura do canal

L_i - Largura de impressão

L_N - Largura nominal

L_v - Largura da barreira (verso)

M - Molar (mole / L)

m² - Metro quadrado

m³ - Metro cúbico

MgCl₂ - Cloreto de Magnésio

min - Minuto

mL - Mililitro

mm - Milímetro

mM - Milimolar (milimole / Litro)

mm² - Milímetro quadrado
N - Nitrogénio
n - Número de refração
NaCl - Cloreto de Sódio
nm - Nanómetro
nM - nanomolar (nanomole / Litro)
nº - Número
O - Oxigénio
° C - Graus Celsius
pmol - picomole
SiO₂ - Dióxido de Silício
T - Temperatura
t - Tempo
Tr - Transmitância
U - Unidades
u.a. - Unidades Arbitrárias
V - Volume
v/v - Volume por volume
Z - Número Atómico
γ - Tensão superficial
γ_{LG} - Tensão superficial da interface líquido-gás
γ_{SG} - Tensão superficial da interface sólido-gás
γ_{SL} - Tensão superficial da interface sólido-líquido
η - Viscosidade
Θ_c - Ângulo de contacto
θ_{hkl} - Ângulo de Bragg
λ_{visível} - Comprimento de onda visível
μL - Microlitro
μm - Micrómetro
ρ - densidade
φ_{ar} - Fração de ar

Índice de Matérias

Agradecimentos	xi
Resumo	xiii
Abstract	xv
Lista de Acrónimos	xvii
Lista de Símbolos	xix
Índice de Matérias	xxi
Índice de Figuras	xxiii
Índice de Tabelas	xxvii
Enquadramento e Objectivos	xxix
1 Introdução	1
1.1 Papel	1
1.1.1 Fontes de celulose	1
1.1.2 Composição do papel	2
1.1.3 Fabrico do papel	3
1.2 Microfluídica	4
1.2.1 Microfluídica em papel	5
1.2.2 Estado de arte	5
1.3 Biossensores	6
1.3.1 Glucose	7
1.3.2 Tuberculose	9
1.3.3 Leishmaniose canina	12
2 Técnicas de Caracterização	15
2.1 Microscopia electrónica de varrimento	15
2.1.1 Espectroscopia dispersiva de raios-X	16
2.2 Difração de raios-X	17
2.3 Fluorescência de raios-X	18
2.4 Espectroscopia do infravermelho por transformada de Fourier	19
2.5 Análise Térmica	20
2.5.1 Análise Termogravimétrica	20
2.5.2 Calorimetria Diferencial de Varrimento	21
2.6 Ângulo de Contacto	21
2.7 Porosimetria	23
3 Materiais e Métodos Experimentais	25

3.1	Materiais	25
3.2	Preparação do substrato	26
3.3	Fabricação dos dispositivos	26
3.4	Determinação da resolução do método	28
3.4.1	Largura da barreira	29
3.4.2	Largura do canal	29
3.5	Preparação dos dispositivos para as aplicações desenvolvidas	31
3.5.1	Dispositivo para medição do pH de soluções aquosas	31
3.5.2	Dispositivo para medição do nível de glucose de soluções	32
3.5.3	Dispositivo para diagnóstico de tuberculose - <i>Gold on Paper</i>	34
3.5.4	Dispositivo para diagnóstico da leishmaniose canina	36
4	Apresentação e Discussão de Resultados	39
4.1	Caracterização dos substratos de celulose	39
4.1.1	Microscopia electrónica de varrimento	40
4.1.2	Difração de raios-X	45
4.1.3	Fluorescência de raios-X	47
4.1.4	Ângulo de contacto	48
4.1.5	Análise térmica	49
4.1.6	Espectroscopia do infravermelho por transformada de Fourier	50
4.1.7	Porosimetria	52
4.2	Caracterização da cera de impressão	53
4.2.1	Microscopia electrónica de varrimento	53
4.2.2	Fluorescência de raios-X	54
4.2.3	Difração de raios-X	55
4.2.4	Análise térmica	55
4.3	Escolha do substrato	56
4.4	Técnica de impressão	57
4.5	Estudo da difusão da cera de impressão no substrato	59
4.5.1	Influência da orientação da impressão e do substrato	62
4.5.2	Influência do tempo e da temperatura	65
4.6	Estudo da resolução do método	68
4.6.1	Largura da barreira hidrofóbica	68
4.6.2	Largura do canal hidrófilo	70
4.7	Aplicações desenvolvidas	72
4.7.1	Dispositivo para medição do pH de soluções aquosas	72
4.7.2	Dispositivo para medição do nível de glucose de soluções	73
4.7.3	Dispositivo para diagnóstico de tuberculose - <i>Gold on Paper</i>	78
4.7.4	Dispositivo para diagnóstico de leishmaniose canina	81
5	Conclusões e Propostas de Trabalho Futuro	85
	Bibliografia	87
	Anexos	93

Índice de Figuras

Figura 1.1: Estrutura da celulose [5] e origem das fibras de celulose (adaptado de [6]).....	3
Figura 1.2: Aplicações dos dispositivos <i>point-of-care</i> (adaptado de [41]).	7
Figura 1.3: Reações enzimáticas que permitem a determinação colorimétrica da concentração de glucose de uma solução biológica.	8
Figura 1.4: Estimativa da taxa de incidência mundial da tuberculose em 2010 (adaptado de [47]).....	9
Figura 1.5: Ressonância de plasmónica de superfície (adaptado de [52]).	11
Figura 1.6: Ensaio de hibridação <i>non-crosslinking</i> com nanosondas de ouro. O aumento da força iónica provoca a agregação das nanosondas (solução azul), que é impedida pela presença da sequência alvo complementar (adaptado de [48]).....	11
Figura 1.7: Mapa mundial das zonas onde a Leishmaniose Visceral é endémica (A) [59]. Imagem obtida por microscopia de varrimento electrónico de uma forma promastigota de <i>Leishmania</i> (B) e mosquito do género <i>Phlebotomus</i> responsável pela transmissão dos parasitas (C) [57].....	12
Figura 1.8: Teste de diagnóstico serológico imunocromatográfico com base no antígeno rK39 para Leishmaniose Visceral (adaptado de [59]).....	13
Figura 1.9: Componentes de um dispositivo de fluxo lateral (adaptado de [41]).....	14
Figura 2.1: Equipamento Carl Zeiss AURIGA Crossbeam SEM-FIB usado na caracterização dos materiais.	16
Figura 2.2: Equipamento de difração de raios-X X'Pert Pro da PANalytical usado na caracterização dos materiais.....	18
Figura 2.3: Equipamento FTIR utilizado na caracterização dos substratos.....	20
Figura 2.4: Relação entre o ângulo de contacto e a tensão superficial das diferentes interfaces (adaptado de [75]).	22
Figura 2.5: Equipamento OCA 20 da Data Physics utilizado na medição do ângulo de contacto dos substratos em estudo.	22
Figura 2.6: Porosímetro de mercúrio AutoPore IV da Micromeritics usado para determinar o diâmetro médio dos poros do papel Whatman nº1.....	24
Figura 3.1: Esquema representativo das etapas de impressão (A), difusão da cera (B) e encapsulamento (C). Efeitos de cada etapa na condução de soluções pelo substrato (D), (E) e (F), respectivamente.....	27
Figura 3.2: Impressora de tinta sólida Xerox ColorQube 8570 (A) e placa de aquecimento Heidolph MR Hei-Tec (B).	27
Figura 3.3: Esquema representativo da difusão da cera.	28
Figura 3.4: Matrizes de canais verticais (A), horizontais (B) e poços (C) utilizadas na determinação da largura da barreira hidrófoba.	29
Figura 3.5: Esquema representativo do método utilizado na determinação da resolução do canal hidrófilo.....	30

Figura 3.6: Desenho dos padrões e esquema das etapas de fabricação do dispositivo para medição do pH de soluções aquosas.....	31
Figura 3.7: Desenho dos padrões e esquema das etapas de fabricação do dispositivo para determinação da concentração de glucose em soluções.	32
Figura 3.8: Disposição dos indicadores no biossensor de glucose.	33
Figura 3.9: Desenho da microplaca standard de 384 poços para impressão.	34
Figura 3.10: Desenho dos padrões e esquema das etapas de fabricação do dispositivo para diagnóstico da Leishmaniose canina.	36
Figura 3.11: Sistema de interruptores de fluxo utilizados para depositar os reagentes nas linhas de teste e controlo do dispositivo para diagnóstico da Leishmaniose canina.....	37
Figura 4.1: Imagens de SEM do papel Whatman nº1 com ampliação 100x (esquerda) e ampliação 1000x (direita).	41
Figura 4.2: Imagens de SEM do papel branco com ampliação 100x (esquerda) e ampliação 1000x (direita).	41
Figura 4.3: Imagens de SEM do papel reciclado com ampliação 100x (esquerda) e ampliação 1000x (direita).	42
Figura 4.4: Imagens de SEM do filtro de café com ampliação 100x (esquerda) e ampliação 1000x (direita).	42
Figura 4.5: Imagens de SEM da Nitrocelulose com ampliação 100x (esquerda em cima), ampliação 1000x (direita em cima), ampliação 3500x (esquerda em baixa) e ampliação 10 000x (direita em baixo).	43
Figura 4.6: Espectros EDS dos substratos em estudo.	44
Figura 4.7: Difractogramas dos substratos em estudo.	45
Figura 4.8: Difractograma da Nitrocelulose.	46
Figura 4.9: Ângulo de contacto dos substratos em estudo.	49
Figura 4.10: Análise termogravimétrica e calorimetria diferencial de varrimento dos substratos papel de cromatografia Whatman nº1 (esquerda) e Nitrocelulose (direita).	50
Figura 4.11: Espectro FTIR do papel Whatman nº1.	51
Figura 4.12: Intrusão Cumulativa e Diferencial do mercúrio em função do diâmetro dos poros do papel Whatman nº1.	52
Figura 4.13: Volume em percentagem em função do diâmetro do poro.	52
Figura 4.14: Imagens de SEM da cera de impressão com ampliação 10 000x (esquerda) e ampliação 20 000x (direita).	53
Figura 4.15: Espectro EDS da cera de impressão.	54
Figura 4.16: Difractograma da cera de impressão em comparação com o de cera de parafina.	55
Figura 4.17: Análise termogravimétrica e calorimetria diferencial de varrimento da cera de impressão.	56
Figura 4.18: Tinteiros de tinta sólida.	57
Figura 4.19: Visão esquemática do interior de uma impressora de tinta sólida. A tinta semi-sólida é transferida do tambor para a folha de papel pré-aquecida. O caminho duplo permite a impressão da frente e verso (adaptado de [92]).	58
Figura 4.20: Imagens obtidas por microscopia óptica de linhas impressas com larguras nominais entre 100 e 700 μm (incrementos de 100 μm).	58
Figura 4.21: Imagens ilustrativas da difusão da cera no papel.	59

Figura 4.22: Largura dos padrões após impressão e das barreiras (frente e verso do papel) após difusão a 140°C durante 2 minutos, em função da largura nominal dos padrões.	60
Figura 4.23: Difusão lateral para um processo de difusão a 140 °C durante 2 minutos. Os resultados foram ajustados a uma equação polinomial de segundo grau de equação $d = 168,05 + 0,71324LN - 0,00055463LN$ com $R^2 = 0,99156$	61
Figura 4.24: Imagens obtidas por SEM da cera impressa na superfície do papel Whatman nº1.	62
Figura 4.25: Imagens obtidas por SEM da cera depois de difundida por toda a espessura do papel Whatman nº1.	62
Figura 4.26: Diferença entre a impressão de uma linha vertical (A) e horizontal (B).	63
Figura 4.27: Demonstração gráfica dos resultados obtidos para linhas impressas segundo as seguintes combinações: Impressão Horizontal Corte Vertical (IH CV), Impressão Vertical Corte Horizontal (IV CH), Impressão Vertical Corte Vertical (IV CV) e Impressão Horizontal Corte Horizontal (IH CH).	63
Figura 4.28: Demonstração gráfica da influência da orientação do papel na largura das barreiras na frente do papel para Impressão Vertical e Impressão Horizontal.	64
Figura 4.29: Demonstração gráfica da influência da orientação do papel na largura das barreiras no verso do papel para Impressão Vertical e Impressão Horizontal.	65
Figura 4.30: Demonstração gráfica da influência da duração do processo de difusão da cera na largura das barreiras para as temperaturas de 80 °C e 160 °C.	66
Figura 4.31: Demonstração gráfica da influência da duração do processo de difusão da cera na largura das barreiras para as temperaturas de 80 °C e 160 °C.	66
Figura 4.32: Demonstração gráfica da influência da temperatura do processo de difusão da cera na largura das barreiras na frente do papel.	67
Figura 4.33: Demonstração gráfica da influência da temperatura do processo de difusão da cera na largura das barreiras no verso do papel.	67
Figura 4.34: Demonstração gráfica da influência da temperatura na largura de barreiras na frente do papel de larguras nominais $L_N = 400 \mu m$ (esquerda) e $L_N = 600 \mu m$ (direita).	68
Figura 4.35: Rendimento de barreiras verticais em função da largura nominal para processos de difusão a diferentes temperaturas e duração de dois minutos.	69
Figura 4.36: Rendimento de barreiras horizontais em função da largura nominal para processos de difusão a diferentes temperaturas e duração de dois minutos.	69
Figura 4.37: Rendimento de poços em função da largura nominal para processos de difusão a diferentes temperaturas e duração de dois minutos.	70
Figura 4.38: Resultados obtidos no estudo da resolução do canal hidrófilo. O valor apresentado sobre os canais traduz a distância entre os centros das barreiras e é apresentado em centímetros.	71
Figura 4.39: Ilustração dos resultados obtidos com o sensor de pH.	72
Figura 4.40: Determinação do volume mínimo da solução a testar que pode ser utilizado no sensor de glucose.	73
Figura 4.41: Ilustração dos resultados obtidos com o sensor de glucose.	74
Figura 4.42: Análise RGB dos diferentes indicadores para as diversas concentrações de glucose.	75
Figura 4.43: Análise RGB dos diferentes indicadores para concentrações de glucose inferiores a 1 mM.	76

Figura 4.44: Curvas de calibração para os diferentes indicadores. Os resultados foram divididos em dois canais RGB, verde para baixas concentrações e azul para concentrações elevadas.	77
Figura 4.45: Ilustração dos resultados obtidos com o sensor de glucose encapsulado.....	77
Figura 4.46: Ilustração da utilização do dispositivo de papel para diagnóstico da tuberculose	79
Figura 4.47: Resultados do ensaio de nanossondas para identificação de MTBC utilizando o método convencional com leitor de microplacas (A), o método da microplaca de papel e análise realizada a partir do software ImageJ (B) e com a aplicação de telemóvel ColorPikr (C).	79
Figura 4.48: Fotografias e imagens SEM dos três tipos de poços apresentados no diagnóstico molecular <i>Gold on paper</i> : microplaca de papel (A), identificação de uma amostra positiva para o complexo <i>M. tuberculosis</i> (B) e amostra negativa para um alvo com ADN não MTBC.	80
Figura 4.49: Ilustração do sistema de interruptores utilizado na deposição de reagentes nas linhas de teste e controlo.	81
Figura 4.50: Ilustração do resultado obtido para a linha de teste com o dispositivo para diagnóstico de Leishmaniose canina.....	82
Figura 4.51: Análise RGB do resultado do dispositivo para diagnóstico de Leishmaniose canina.	82
Figura 4.52: Linha de controlo.....	83
AnexoI.1: Demonstração gráfica da influência da temperatura do processo de difusão da cera, com duração de um minuto, na largura das barreiras na frente do papel.	93
AnexoI.2: Demonstração gráfica da influência da temperatura do processo de difusão da cera, com duração de um minuto, na largura das barreiras no verso do papel.	93
AnexoII.1: Rendimento de barreiras verticais em função da largura nominal para processos de difusão a diferentes temperaturas e duração de um minuto.	94
AnexoII.2: Rendimento de barreiras horizontais em função da largura nominal para processos de difusão a diferentes temperaturas e duração de um minuto.	94
AnexoII.3: Rendimento dos poços em função da largura nominal para processos de difusão a diferentes temperaturas e duração de um minuto.	95
AnexoIII.1: Diferentes etapas da fabricação do sensor de pH.	96
AnexoIII.2: Diferentes etapas da fabricação do sensor de glucose.	97
AnexoIII.3: Diferentes etapas da fabricação do teste de diagnóstico de Leishmaniose canina.	98

Índice de Tabelas

Tabela 3.1: Concentração molar de glucose para cada nível padrão de solução artificial.	33
Tabela 4.1: Propriedades macroscópicas dos diferentes substratos estudados.....	40
Tabela 4.2: Índice de cristalinidade dos diferentes substratos.	47
Tabela 4.3: Concentração dos elementos presentes nos substratos.	48
Tabela 4.4: Concentração relativa dos elementos detetados na cera de impressão.	54
Tabela 4.5: Largura da linha impressa em função da largura nominal. Tabela e representação gráfica.	59
Tabela 4.6: Largura do canal hidrófilo.....	71
Tabela 4.7: Custos de produção do sensor de pH.	72
Tabela 4.8: Custos de produção do sensor de glucose.	78

Enquadramento e Objectivos

O papel há muito que é utilizado como suporte para a movimentação, e consequente estudo, de fluídos. Desde os anos 40 que o papel é usado para cromatografia possibilitando a separação e análise dos constituintes de um fluído. Por outro lado o papel também permite efetuar filtrações em laboratório, algo que possibilitou a sua optimização no que toca à porosidade e pureza celulósica.

Mostrando-se como um excelente meio de transporte para líquidos, o papel precisa apenas de ser padronizado para que seja possível controlar fluxos de fluídos. A cera é um material que partilha com o papel vantagens como baixo custo. Devido à facilidade com que pode ser usada principalmente por haver mecanismos próprios para o efeito e por a sua eficácia hidrófoba, a cera mostra-se como uma excelente opção no que toca à constituição de canais no papel.

Neste trabalho pretende-se mostrar a utilização de dispositivos feitos de papel e cera para diagnóstico e análises clínicas. Por todas as vantagens da tecnologia a sua aplicação na saúde é incontornável e fundamental.

Como estudante de Engenharia Biomédica vi neste tema uma perfeita oportunidade de fazer aquilo para que estudei: adaptar métodos físicos e químicos à saúde humana de maneira a encontrar ou otimizar novas soluções.

A exploração da área dos materiais é também um chamariz neste projeto. Os materiais são um conhecimento transversal à engenharia e uma área que atravessa um momento muito importante na investigação.

Os objetivos do trabalho são a caracterização e estudo dos materiais constituintes dos biossensores de papel para fluxo lateral bem como o estudo da sua aplicação a patologias como a leishmaniose canina e a tuberculose, bem como a determinação do nível de glucose ou pH de soluções.

Introdução

1.1 Papel

O papel tem sido um material essencial à civilização desde a sua invenção e, devido à familiaridade adquirida, não é encarado como um material particularmente complexo. No entanto, devido à sua origem vegetal, apresenta enorme complexidade tanto a nível morfológico como a nível químico.

Quando se fala em papel pensa-se inicialmente num meio de escrita e impressão. No entanto existem muitas outras aplicações para este material. Cerca de 40% do papel produzido mundialmente é utilizado para fins comunicativos e mais de 50% é usado para embalagens e papéis utilitários (lenços, papel absorvente, entre outros). O restante é utilizado em aplicações especializadas como saquetas de chá, meio de filtração e isolamento elétrico.

O papel é, por definição, um material fino e flexível, constituído por uma rede de fibras de celulose naturais que são depositadas a partir de uma suspensão aquosa. O material que se obtém é uma rede de fibras interligadas que formam uma estrutura tridimensional com espessura média entre 30 e 300 μm . O diâmetro de uma fibra de celulose está compreendido entre 10 e 50 μm , pelo que uma folha de papel com espessura de 100 μm tem entre 5 e 10 fibras de espessura [1].

A invenção do papel remonta a 105 A.C. e é atribuída a Cai Lun, um oficial da dinastia chinesa Han (202 A.C. - 220 D.C.), que utilizava fragmentos de cascas de amoreira, pedaços de bambu, rami, redes de pesca, pedaços de algodão e cal para extrair as fibras. As fibras eram então introduzidas num recipiente com água e filtradas com agitação. Após compressão sobre uma matriz têxtil filtrante esta fina camada de fibras originava o que conhecemos hoje como papel [2], [3].

1.1.1 Fontes de celulose

As fibras utilizadas no fabrico do papel são constituintes estruturais das células das plantas. Apesar de diversas plantas poderem ser utilizadas para extração de fibras celulósicas, fatores como disponibilidade, rendimento por hectare e qualidade das fibras têm influência sobre a escolha da fonte destas fibras. No final do século XIX e princípio do século XX a fonte principal de fibras de celulose da indústria do papel era o algodão, sob a forma de desperdícios da indústria têxtil. Durante este período a indústria do papel prosperou em redor da indústria têxtil. Após este período verificou-se um aumento exponencial do consumo de materiais de papel e a indústria têxtil deixou de satisfazer a procura da indústria papeleira. A madeira transformou-se, progressivamente, na principal fonte de fibra. No final do século XX, 90% da fibra virgem (excluindo fibra reciclada) utilizada no fabrico de papel era extraída da madeira [1].

No fabrico do papel são predominantemente utilizados dois tipos de madeira. A madeira de lei ou madeira dura (*hardwood*) provém de plantas angiospérmicas, como o eucalipto, que são plantas espermatófitas cujas sementes estão protegidas por uma estrutura denominada fruto. As fibras que as suportam são curtas mas desempenham um papel crucial na formação das folhas de papel. A madeira macia (*softwood*) provém de plantas gimnospérmicas que são plantas vasculares cujas sementes encontram-se expostas, como o pinheiro, o cipreste ou a sequóia. São evolucionariamente mais antigas que as angiospérmicas e consequentemente apresentam uma estrutura menos complexa. A madeira macia é a mais utilizada no fabrico do papel uma vez que as suas fibras são comparativamente mais longas. A madeira dura apresenta fibras relativamente curtas e maior quantidade de hemicelulose, o que resulta numa fibra enfraquecida.

Para além da madeira existem variadas plantas das quais são extraídas fibras de celulose. As principais fontes de celulose alternativas à madeira são bagaço da cana de açúcar, bambu, juta, cânhamo, linho, algodão e também algumas gramíneas como trigo, cevada ou arroz. Apesar de representarem uma pequena percentagem do volume de fibras virgens inseridas na indústria do papel, apresentam algumas vantagens. Podem frequentemente ser produzidas em áreas onde não é possível plantar árvores. Produzem geralmente uma colheita anual com maior rendimento que a madeira e atingem a maturidade em menor tempo que a maioria das árvores, que podem demorar cerca de dez ou vinte anos a atingir a maturidade necessária.

Existem também bactérias que produzem celulose, muito embora este tipo de celulose não seja utilizado no fabrico do papel [1].

1.1.2 Composição do papel

A composição química do papel depende da fonte de celulose e do tratamento químico ao qual a madeira foi submetida para produzir a pasta de papel. Quando a pasta de papel não é tratada quimicamente a sua composição é muito semelhante à composição da fonte de celulose.

A parede celular vegetal é um material compósito complexo que tem compostos com funções estruturais e não-estruturais. Os seus principais componentes são a celulose, a hemicelulose e a lenhina.

A celulose é o principal elemento estrutural da parede celular da grande maioria das plantas, devido ao seu elevado grau de polimerização e cristalinidade. É um polissacarídeo linear e homogéneo cujo monómero é β -1,4-D-glucopirranose. Encontra-se organizada em microfibrilas que formam a unidade cristalina da celulose. O grau de cristalinidade da celulose depende da sua fonte. Celulose de algodão e de alguns tipos de algas apresentam uma elevada cristalinidade, enquanto que a celulose da madeira tende a ser menos cristalina, com índices de cristalinidade entre 50 e 90% [1], [4].

Devido ao seu elevado grau de polimerização e cristalinidade a celulose é responsável pela resistência das fibras. Quimicamente são as ligações por pontes de hidrogénio entre os grupos hidroxilo dos monómeros de glucose que constituem a forte interação existente entre as moléculas de celulose e originam a formação das fibras (ver Figura 1.1). Também na formação da folha de papel é esta interligação por pontes de hidrogénio que proporciona a interação entre as fibras de celulose que constituem o papel, concedendo a resistência necessária para a sua formação [2].

A hemicelulose é formada por um conjunto heterogéneo de polissacarídeos com baixo grau de polimerização. Forma uma matriz que envolve as microfibrilas de celulose através de interações como

pontes de hidrogénio e forças de Van der Waals, desempenhando um papel importante na ligação entre a celulose cristalina e a lenhina amorfa. As hemiceluloses são benéficas para as propriedades do papel, embora as razões para tal não sejam bem compreendidas. A resistência à tração do papel, por exemplo, correlaciona positivamente com o conteúdo de hemicelulose.

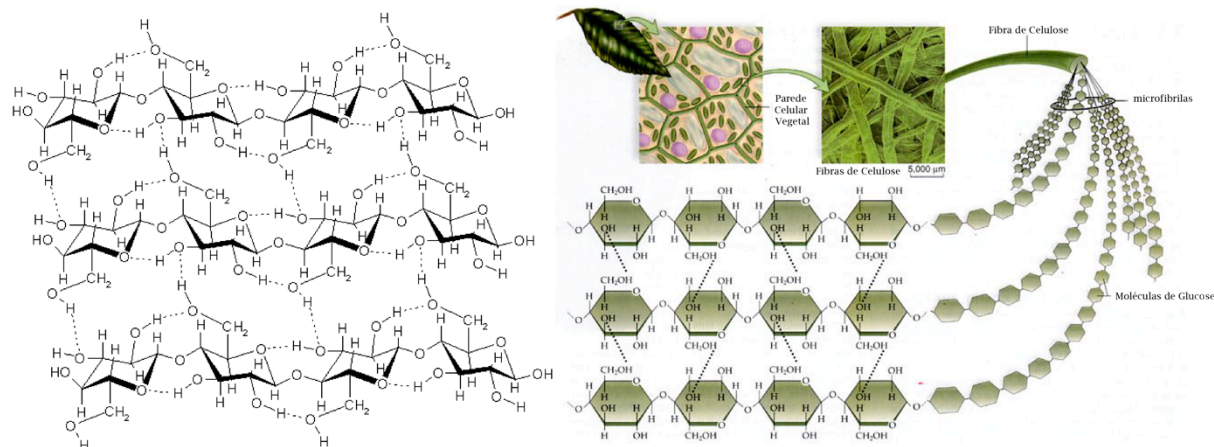


Figura 1.1: Estrutura da celulose [5] e origem das fibras de celulose (adaptado de [6]).

A lenhina representa entre 10 e 30% do peso da madeira. É um polímero aromático com uma estrutura extremamente complexa que reforça e agrega o material fibroso da madeira, conferindo-lhe resistência mecânica e proteção contra microrganismos patogénicos. Além disso, as suas propriedades hidrofóbicas permitem o controlo do conteúdo de água. Uma vez que oxida fotoquimicamente é responsável pelo amarelecimento e fragilidade do papel, pelo que a sua remoção da pasta de papel é fundamental para a obtenção de um produto estável e duradouro. O papel de jornal é um bom exemplo dos efeitos da presença de lenhina na pasta de papel [1].

1.1.3 Fabrico do papel

A primeira etapa da fabricação do papel é a formação da pasta de celulose, que pode ser realizada por dois métodos distintos: polpação mecânica ou química. O processo mecânico consiste na trituração da madeira até esta se tornar numa polpa. Produz fibras curtas e danificadas e não separa os outros compostos da madeira, pelo que a composição da pasta é muito semelhante à da fonte de celulose. O processo químico pode ser ácido (*sulfite pulping*) ou básico (*Kraft pulping*) e é usado para decompor seletivamente a lenhina presente na madeira. Devido à lenhina residual, o produto resultante apresenta uma cor acastanhada, pelo que é comum ser submetido a processos de branqueamento [7], [8].

Seguidamente as fibras passam por um processo de pré tratamento que se divide em duas fases, dispersão e refinação. A dispersão assegura a separação e uniformização das fibras da pasta na suspensão aquosa. A refinação, processo que obriga as fibras em suspensão a passar entre duas placas metálicas, uma móvel e uma estacionária, altera as características das fibras através de processos mecânicos e hidráulicos, influenciando as propriedades da folha de papel. Uma folha feita a partir de fibras não refinadas é pouco coesa, muito volumosa, possui elevada capacidade de absorção, elevada porosidade e opacidade e uma estrutura irregular [1].

No fabrico do papel os aditivos são a segunda matéria-prima, depois das fibras de celulose. A tendência é aumentar a proporção de aditivos no papel e baixar a quantidade de fibras, reduzindo os custos de produção e simultaneamente contribuindo para a sustentabilidade das florestas. Os aditivos melhoram a qualidade do papel a nível de massa, opacidade, brancura e características de impressão. A caulinita e o carbonato de cálcio são os aditivos mais usados na indústria do papel [9].

A formação da folha começa pela remoção de água, num tapete equipado com drenagem simples e vácuo. De seguida, a pasta é prensada, seca e por fim bobinada em grandes rolos. Neste circuito os processos de secagem são variados, incluindo também a passagem por soluções que aplicam tratamentos superficiais ao papel [2], [8].

1.2 Microfluídica

A microfluídica é uma área emergente da ciência e tecnologia que se refere à manipulação e processamento de volumes de fluídos na ordem dos micro ou nano litros. Utiliza sistemas e dispositivos de dimensões reduzidas onde são implementados canais com geometrias submilimétricas através dos quais os fluídos são conduzidos até regiões de interesse.

A microfluídica apresenta diversas vantagens sobre as tecnologias convencionais. A redução do consumo de reagentes, do tempo de obtenção de resultados e a simplicidade da sua análise, associadas à facilidade de produção em massa tornam a microfluídica muito atractiva. Atualmente encontra-se presente em domínios da biologia, química, medicina e materiais.

Os primeiros dispositivos microfluídicos eram fabricados a partir de silício ou vidro, uma vez que a tecnologia necessária estava já desenvolvida pela indústria dos semicondutores. Na última década do século XX verificou-se um esforço comum no sentido de fabricar dispositivos poliméricos, que permitissem a redução dos custos e velocidade de produção e que fossem descartáveis [10].

O objetivo principal de um sistema microfluídico é o manuseamento de fluídos. Um fluído, líquido ou gás, é definido como uma substância que não oferece resistência finita à sua própria deformação, quando solicitada por forças externas. Resiste, porém, à velocidade de deformação. A viscosidade é a propriedade termodinâmica característica de cada fluído que traduz a resistência ao deslizamento entre camadas adjacentes do fluído [11].

Um líquido tende a formar uma superfície livre, ou seja, uma interface que o separa de um gás ou de outro líquido. Esta interface encontra-se sujeita a uma força de atração molecular que atua ao longo da mesma. De modo a manter o equilíbrio na interface face à pressão que as moléculas da superfície realizam sobre o interior, este realiza uma contra força. A situação de equilíbrio corresponde, como indica a segunda lei da termodinâmica, ao estado de energia mínima, o que implica a redução da área de superfície exterior. A superfície livre está, pois, sobre tensão, denominada tensão superficial e que se exerce tangencialmente à superfície [11], [12].

Na análise das propriedades físicas de um micro sistema é importante ter em conta os factores de escala que expressam a variação de quantidades físicas em função do tamanho do sistema ou do objecto em estudo, mantendo quantidades como tempo, pressão e temperatura constantes. Deste modo, determinadas forças que têm grande factor de impacto macroscopicamente tornam-se menos influenciáveis a uma escala microscópica. Um bom exemplo é a razão entre as forças de volume, como

a gravidade e inércia, e as forças de superfície, como tensão superficial e viscosidade. O factor de escala associado ao rácio entre estas duas classes de forças pode geralmente ser expresso segundo:

$$\frac{\text{forças de superfície}}{\text{forças de volume}} = \frac{l^2}{l^3} = l^{-1} \xrightarrow{l \rightarrow 0} \infty \quad \text{Eq. 1.1}$$

Isto implica que, à escala dos sistemas lab-on-a-chip, as forças volúmicas tornam-se muito pouco significativas, enquanto que as forças de superfície tornam-se dominantes [13].

1.2.1 Microfluídica em papel

A microfluídica em papel utiliza papel como substrato, ou seja, o controlo dos volumes é feito no interior do papel. O papel é, inequivocamente, um material orgânico muito barato e é compatível com a grande maioria das aplicações químicas, bioquímicas e médicas. Para além disso, a rede fibrosa que o constitui permite o transporte de líquidos através de forças capilares.

Capilares são tubos com diâmetros muito reduzidos de dimensão microscópica ou inferior. Quando a aderência do líquido às paredes do capilar, na presença do ar, excede a coesão do próprio líquido, este tende a espalhar-se pelo sólido (fenómeno de *wetting*). Nestas condições a superfície livre encurva, o ângulo de contacto é inferior a 90° e a tensão superficial tem uma resultante que pode ser suficiente para fazer o líquido deslocar-se pelo capilar. Este é o fenómeno conhecido por capilaridade [11].

Washburn demonstra que a taxa de penetração de um líquido num tubo por ação capilar, é diretamente proporcional ao raio do capilar, ao ângulo de contacto, ao rácio entre a tensão de superfície e a viscosidade e inversamente proporcional ao comprimento do percurso já preenchido pelo líquido. Quando o ângulo de contacto é inferior a 90°, ou seja, quando o líquido molha o capilar, a taxa de penetração é independente do ângulo de contacto. Para materiais porosos que se comportam como um conjunto de capilares cilíndricos, a equação de Washburn descreve a penetração do líquido em função do tempo [14].

Na microfluídica em papel a condução dos fluídos é realizada pela rede de fibras do papel. Esta rede de fibras dispersas aleatoriamente gera espaços livres que se comportam como tubos capilares. Através da pressão capilar, os líquidos são conduzidos sem necessidade de aplicar uma força externa. É deste modo um método autossuficiente, pois o transporte dos fluídos não necessita da aplicação de forças externas.

O manuseamento de líquidos no papel é conseguido pela construção de canais hidrófilos de papel, onde os líquidos são conduzidos por ação capilar, delimitados por regiões onde as propriedades do papel são alteradas de modo a impedirem a propagação do fluxo.

1.2.2 Estado de arte

A invenção da microfluídica em papel é atribuída ao grupo de Whitesides da Universidade de Harvard nos Estados Unidos da América. No entanto, Muller conduziu em 1949 um estudo sobre a eluição de uma mistura de pigmentos num canal de papel delimitado por barreiras de parafina [15].

Existem atualmente dez técnicas reportadas para fabricar dispositivos de microfluídica em papel: (i) fotolitografia [16], [17]; (ii) deposição de PDMS (polidimetilsiloxano) [18]; (iii) gravação de

poliestireno a jacto de tinta [19], [20]; (iv) tratamento por plasma [21], [22]; (v) corte de papel [23]; (vi) impressão a cera [24–27]; (vii) impressão a jacto de AKD (*alkyl ketene dimer*) [22], [28]; (viii) impressão flexográfica [29]; (ix) serigrafia [30] e (x) tratamento a laser [31]. O princípio fundamental comum a estas técnicas de fabricação é a criação de canais hidrófilos de dimensões microscópicas delimitados por regiões hidrófobas no papel. A única exceção a esta metodologia é o corte do papel, onde os canais hidrófilos são simplesmente isolados por corte. Estes métodos de padronização do papel podem ser divididos em três categorias distintas, consoante a sua ação sobre as fibras de celulose: (i) bloqueio físico dos poros do papel, que utiliza agentes como SU-8 (fotolitografia) ou PDMS; (ii) deposição física de uma substância hidrófoba na superfície das fibras de celulose, como cera de impressão ou poliestireno e (iii) modificação química da superfície das fibras, através de agentes reativos como o AKD, um aditivo muito utilizado na indústria do papel para tornar o papel hidrófobo.

Em relação ao processo de fabrico os métodos enunciados podem ser classificados como (i) fabricação numa única etapa, que consiste na deposição do agente hidrófobo nas zonas específicas sendo que áreas não tratadas continuam hidrófilas, ou (ii) fabricação em duas etapas, que implica um processo inicial no qual todo o papel é submetido a um tratamento que o torna hidrófobo e posteriormente os canais são novamente alterados para regiões hidrófilas. Da fabricação com uma etapa fazem parte metodologias como impressão a cera e impressão a jacto. A fotolitografia, a gravação de poliestireno e o tratamento de plasma são exemplos de técnicas de fabricação em duas etapas [32].

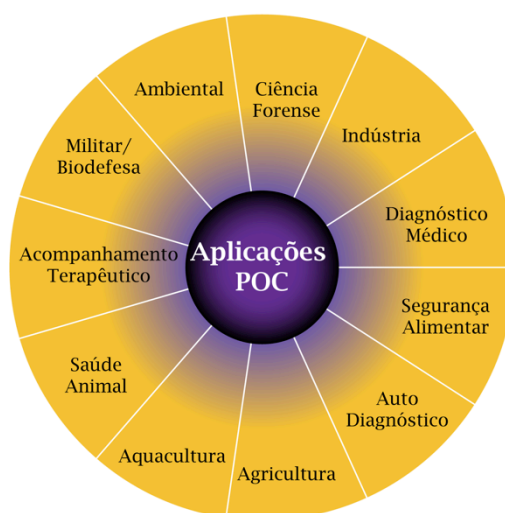
A detecção de analitos nos dispositivos de microfluídica em papel pode ser realizada por quatro métodos distintos: (i) detecção colorimétrica; (ii) detecção electroquímica (EQ); (iii) detecção quimioluminescente (QL) e (iv) detecção electroquimioluminescente (EQL). A detecção colorimétrica está tipicamente associada a reações químicas e enzimáticas com alteração da cor dos produtos. Geralmente os resultados podem ser detetados visualmente, no caso de uma resposta binária (positivo ou negativo) ou semi-quantitativa através da comparação com uma escala colorimétrica. Este modo de detecção permite também a quantificação de analitos por intensidade colorimétrica, que pode ser realizada através de software de tratamento de imagem. A detecção EQ é mais sensível permitindo a quantificação de analitos com concentrações na ordem dos nM. A grande maioria dos projetos desenvolvidos na área explora a detecção colorimétrica [16–18], [20–24], [27–30], [33] e a detecção EQ [34–38]. A QL e EQL são os métodos de detecção óptica mais utilizados em microfluídica convencional, no entanto não têm sido muito explorados na microfluídica em papel. Existem apenas alguns estudos que reportaram o uso destes métodos na detecção de analitos em dispositivos de microfluídica em papel e em microplacas de papel [31], [39], [40].

1.3 Biossensores

Os testes *point-of-care* (POC) tornaram-se relativamente comuns nos países desenvolvidos, o melhor exemplo sendo o teste rápido da gravidez, como método complementar à medicina tradicional, demonstrando um papel muito importante no aumento da colaboração dos pacientes. Os testes POC são também necessários nos países em vias de desenvolvimento pois permitem reduzir o número de deslocações aos serviços clínicos e, conseqüentemente, as despesas médicas, para além de providenciarem meios de rastreio em regiões sem acesso a infraestruturas médicas e hospitalares [33].

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estabeleceu diretivas para o desenvolvimento de testes de diagnóstico para utilização em regiões economicamente desfavorecidas, conhecidas sob o acrónimo ASSURED (Affordable, Sensitive, Specific, User-friendly, Rapid and Robust, Equipment-free and Delivered to those in need). As áreas de aplicação dos testes POC são muito variadas como se pode verificar na Figura 1.2.

O principal objetivo dos dispositivos de microfluídica em papel é providenciar plataformas para a realização de testes POC com as características especificadas pela OMS.



Inclui aplicações como identificação de produtos, vigilância ambiental e segurança

Figura 1.2: Aplicações dos dispositivos *point-of-care* (adaptado de [41]).

1.3.1 Glucose

A glucose é a fonte primária de energia das células, enquanto que os lípidos são principalmente um reservatório de energia. A glucose é transportada desde os intestinos ou fígado até às células através da corrente sanguínea. O valor médio da concentração de glucose no sangue em humanos é de 4 mM, ou seja 72 mg/dL. No entanto este valor tende a variar durante dia. Os valores mais baixos são detetados de manhã em jejum (valores saudáveis entre os 70 e os 130 mg/dL) e tendem a aumentar depois das refeições, em que o valor saudável é inferior a 180 mg/dL [42].

Uma concentração de glucose no sangue fora dos intervalos normais pode indicar uma condição médica. Uma elevada concentração de açúcar no sangue denomina-se hiperglicemia, enquanto que uma concentração inferior denomina-se hipoglicemia.

A diabetes é uma doença crónica que ocorre quando o pâncreas não produz insulina ou quando o organismo não consegue utilizar a insulina produzida. A insulina é uma hormona que regula a concentração de açúcar no sangue. Hiperglicemia é um efeito comum quando a doença não está controlada e pode causar sérios danos em variados órgãos, especialmente nos nervos e vasos sanguíneos.

Existem dois tipos de diabetes, tipo I e tipo II. A diabetes tipo I é caracterizada pela deficiência na produção de insulina, obrigando os pacientes à administração diária desta hormona. Os sintomas

principais incluem produção excessiva de urina, sede, fome constante, perda de peso, alterações na visão e fadiga. A causa deste tipo de diabetes é desconhecida e não existem atualmente medidas preventivas. A diabetes tipo II resulta do uso ineficaz da insulina produzida. Este tipo de diabetes engloba cerca de 90% das pessoas afetadas pela doença mundialmente e advém principalmente do excesso de peso corporal e inatividade física. Os sintomas são bastante semelhantes aos encontrados no tipo I mas menos marcados, o que leva a um diagnóstico tardio. Destes dois tipos de diabetes destaca-se a diabetes gestacional que ocorre durante a gravidez. Os sintomas são semelhantes aos do tipo II, apesar de normalmente ser diagnosticada nas consultas pré-natais, e não devido à incidência de sintomas.

O diagnóstico é feito através de análises sanguíneas que determinam a concentração de glucose no sangue. É diagnosticada a doença quando a concentração de glucose é superior ou igual a 7 mM em jejum ou sob o efeito da medicação. Nos pacientes com diabetes a concentração de glucose no sangue tem de ser monitorizada regularmente.

Existem mundialmente 347 milhões de pessoas com diabetes. Em 2004, estima-se que 3,4 milhões de pessoas tenham morrido devido a consequências da elevada concentração de açúcar no sangue e a Organização Mundial de Saúde prevê que este valor irá aumentar dois terços até 2030. Mais de 80% das mortes causadas por diabetes ocorrem em países com menores capacidades económicas [43].

No presente trabalho propõe-se um dispositivo enzimático para quantificar a concentração de glucose, que utiliza como substrato o papel. O dispositivo é simples, prático, económico e leve, características indispensáveis para um teste POC. A quantificação é colorimétrica, baseada na intensidade colorimétrica de dois indicadores de oxidação/redução.

A glucose oxidase é frequentemente utilizada, em conjunto com a peroxidase, para determinar colorimetricamente a concentração de glucose em soluções biológicas [33], [44–46]. A oxidação da glucose, catalisada pela glucose oxidase, produz peróxido de hidrogénio, que é posteriormente utilizado pela enzima peroxidase para oxidar os indicadores utilizados. A oxidação destes indicadores traduz-se numa alteração colorimétrica. Estas reações encontram-se esquematizadas na Figura 1.3.

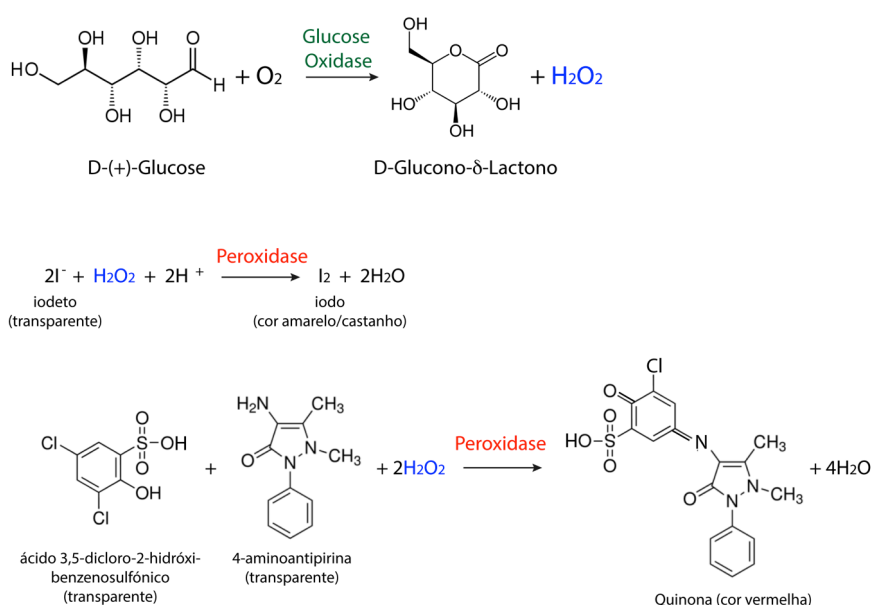


Figura 1.3: Reações enzimáticas que permitem a determinação colorimétrica da concentração de glucose de uma solução biológica.

1.3.2 Tuberculose

De acordo com a OMS a tuberculose (TB) é uma das doenças infecciosas mais preocupantes do mundo, sendo responsável por 1,1 milhões de mortes e 8,8 milhões de novos casos no ano de 2010.

A tuberculose é uma doença infecciosa causada principalmente pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*, Mtb), um membro do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC). Tipicamente afecta os pulmões (TB pulmonar) mas pode também afetar outros órgãos (TB extrapulmonar). A doença é transmitida por via aérea através da expulsão de bactérias por pessoas infetadas. Em geral, apenas uma pequena parcela das pessoas infetadas com Mtb desenvolve a doença, no entanto, sem tratamento a taxa de mortalidade é elevada.

Apesar de estarem disponíveis tratamentos eficazes, a TB continua a ser um grande problema de saúde mundial. A TB é a segunda maior causa de morte entre as doenças infecciosas, apenas sendo superada pelo HIV. A Índia, a China, a Indonésia e o Paquistão figuram entre os cinco países com maior incidência de novos casos de TB em 2010 (Figura 1.4) [47].

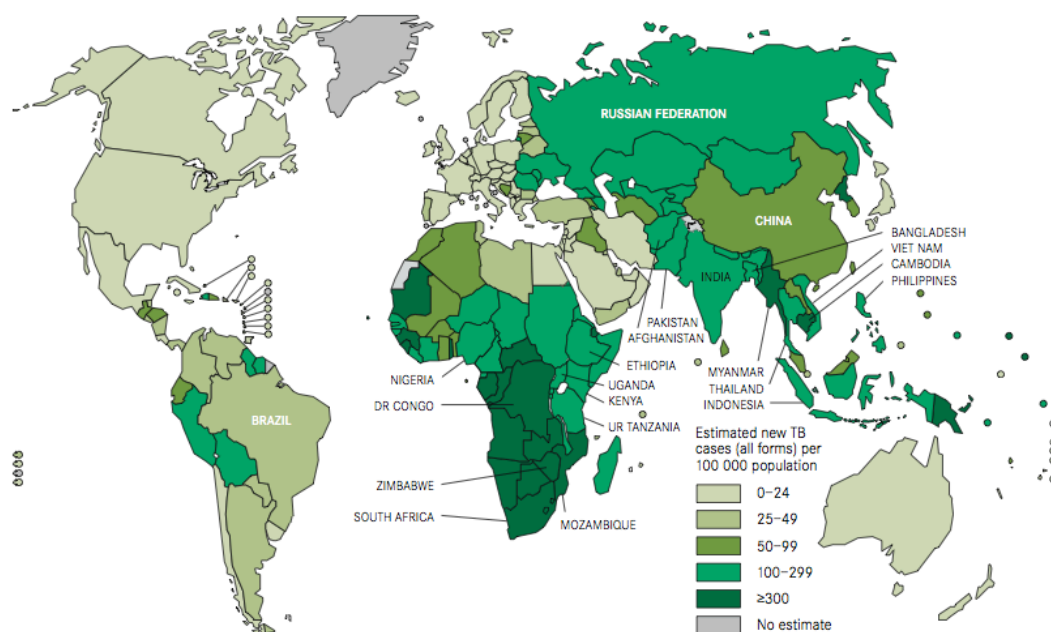


Figura 1.4: Estimativa da taxa de incidência mundial da tuberculose em 2010 (adaptado de [47]).

O método mais utilizado mundialmente para diagnóstico de TB é a baciloscopia, desenvolvido há mais de cem anos, no qual as bactérias são observadas microscopicamente em amostras de expectoração. Este método é relativamente insensível e não pode ser utilizado para identificar TB extrapulmonar. Em países com acesso a infraestruturas especializadas, a TB é diagnosticada via crescimento de culturas do agente, que é atualmente o método mais preciso. Recentemente foram introduzidos os testes de diagnóstico molecular rápidos.

A Organização Mundial de Saúde desenvolveu um plano de ação que enuncia os componentes essenciais para o combate à TB, entre os quais se encontra o desenvolvimento de novos dispositivos de diagnósticos POC [47].

Avanços recentes no diagnóstico molecular da tuberculose melhoraram a capacidade de detecção do agente patogénico, mas a maioria destes métodos requer ainda técnicos especializados e

equipamento laboratorial complexo e dispendioso. Um diagnóstico POC é crucial para o controlo da tuberculose, pois a identificação e caracterização rápida do agente patogénico permitem um tratamento precoce, passo vital para o combate desta pandemia.

Neste sentido foi desenvolvido, em conjunto com o Centro de Investigação em Genética Molecular Humana (CIGMH) do Departamento de Ciências da Vida da FCT-UNL, um dispositivo para diagnóstico molecular da tuberculose que utiliza o papel como suporte e cuja descrição foi recentemente publicada numa revista científica internacional [27].

Neste dispositivo o reconhecimento molecular é feito através da hibridação de uma sequência de ADN (Ácido Desoxirribonucleico) conhecida, a sonda, com uma sequência de ADN desconhecida, o alvo. O ADN é a biomolécula que contém toda a informação genética individual de um organismo. É constituída por uma hélice dupla antiparalela, composta por duas cadeias lineares de nucleótidos. O nucleótido é a unidade básica do ADN e é formado por uma desoxirribose, um grupo fosfato e uma base azotada. Existem quatro bases azotadas (adenina, guanina, citosina e timina) que são complementares e ligam-se especificamente (a adenina à timina e a citosina à guanina) através de pontes de hidrogénio, num fenómeno denominado de hibridação. A informação genética é assim codificada pela sequência linear de bases de ADN, num sistema que permite inúmeras combinações.

A sequência de ADN da sonda é acoplada com um transdutor, especificamente nanopartículas de ouro (AuNPs - *gold nanoparticles*), que permite identificar a ocorrência da hibridação. As AuNPs são conjuntos de átomos de ouro (entre 3 e 1×10^7 átomos) e possuem propriedades interessantes, como comportamento espectral ajustável e facilidade de funcionalização com biomoléculas como anticorpos ou ADN. Por estas razões as AuNPs têm sido exaustivamente estudadas para utilização em biomedicina, especificamente na produção de ensaios de reconhecimento molecular altamente sensíveis e específicos e simultaneamente económicos [48].

A característica física mais importante das AuNPs é a sua dimensão. Propriedades que apresentam interesse biotecnológico, como área específica de superfície, viscosidade e comportamento de agregação, são influenciadas pelo seu tamanho. A agregação é o processo pelo qual duas ou mais partículas se agrupam (agregado), mas não se fundem numa única partícula. As AuNPs encontram-se estabilizadas por uma camada superficial de iões que mantêm uma carga fixa e do mesmo sinal, promovendo a repulsão electrostática e mantendo-as afastadas (cineticamente estáveis). No entanto, por adição de um electrólito, a força iónica do meio é aumentada, atenuando a repulsão electrostática entre as partículas e a suspensão coloidal passa a ser cineticamente instável, originando a agregação [49].

Uma vez que o diâmetro das AuNPs é da mesma ordem de grandeza do comprimento de onda da radiação electromagnética incidente, o campo magnético da luz movimenta colectivamente os electrões condutores, induzindo dipolos instantâneos. Esta oscilação forma um dipolo oscilante efetivo que anula a radiação electromagnética com a mesma frequência. Este fenómeno, denominado ressonância de plasmónica (SPR - *Surface Plasmon Resonance*) é evidenciado pela presença de uma forte banda na região do visível e é responsável pelas cores vivas que as AuNPs apresentam. A frequência de ressonância depende da separação das cargas opostas à superfície, que é função do tamanho, geometria da partícula e da polarização do meio [49–51]. Na Figura 1.5 encontra-se uma representação esquemática da SPR.

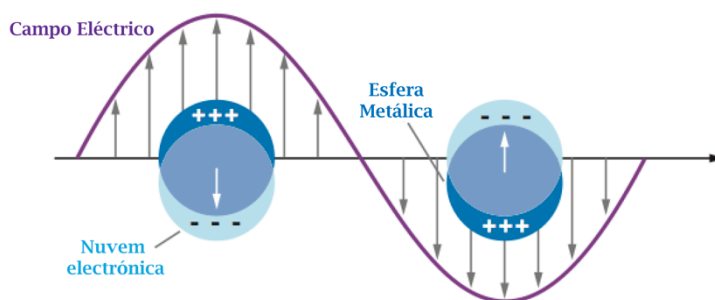


Figura 1.5: Ressonância de plasmônica de superfície (adaptado de [52]).

Macroscopicamente o ouro tem cor amarela, mas nanopartículas esféricas com tamanhos entre 10 e 20 nm assumem uma intensa coloração vermelha, resultante da frequência à qual se verifica a SPR (520 nm). A agregação das partículas provoca um deslocamento da banda SPR para comprimentos de onda mais elevados (600 nm), como se pode observar na Figura 1.6.

Estas AuNPs podem ser diretamente funcionalizadas com oligonucleótidos tiolados, e podem ser utilizadas numa grande diversidade de estratégias de detecção para reconhecimento de sequências específicas de RNA ou DNA. Estas AuNPs funcionalizadas denominam-se nanossondas de ouro [48], [53], [54]. As nanossondas de ouro são a fusão de duas tecnologias: a síntese de AuNPs, pelo método de redução por citrato [55], evidenciando todas as suas propriedades físicas e ópticas, com a tecnologia de funcionalização de superfícies de ouro com oligonucleótidos tiolados, descrita por Storhoff *et al.* [56].

O dispositivo desenvolvido baseou-se no método *non-crosslinking* de hibridação para desenvolver um sistema de detecção de ADN colorimétrico. Este método, representado na Figura 1.6, utiliza uma única população de nanossondas com uma única sequência de ADN.

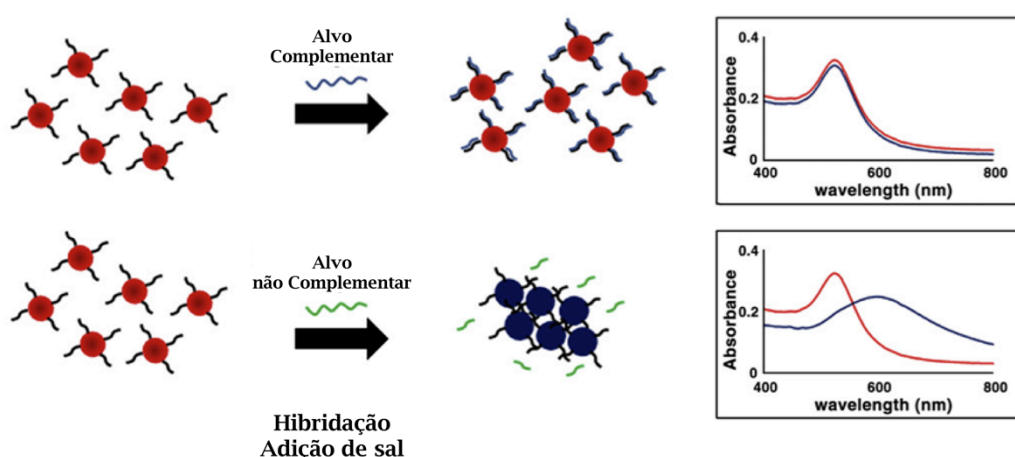


Figura 1.6: Ensaio de hibridação *non-crosslinking* com nanossondas de ouro. O aumento da força iónica provoca a agregação das nanossondas (solução azul), que é impedida pela presença da sequência alvo complementar (adaptado de [48])

O fenómeno de agregação é induzido através do aumento da força iónica do meio por adição de sal, no entanto, a hibridação de alvos com a nanossonda aumenta a sua estabilidade, impedindo a agregação [49].

1.3.3 Leishmaniose canina

A Leishmaniose é uma das doenças infecciosas do mundo mais preocupantes e encontra-se difundida no Mediterrâneo, África, Médio Oriente, Ásia e América do Sul. É transmitida através da picada de um mosquito do género *Phlebotomus* e é uma doença sistémica grave, de curso lento e crónico.

Os parasitas do género *Leishmania* são responsáveis pela doença e apresentam duas formas no seu ciclo de vida: uma forma promastigota flagelada encontrada no trato digestivo do vector (flebótomo), e uma forma amastigota, que se desenvolve no interior dos macrófagos dos hospedeiros vertebrados. Apenas as fêmeas dos mosquitos *Phlebotomus* transmitem a doença através da picada na pele dos hospedeiros, com a consequente inoculação dos promastigotas na corrente sanguínea. Os parasitas são então interiorizados pelos macrófagos e transformam-se na forma amastigota, perdendo o flagelo. No hospedeiro, sobrevivem e multiplicam-se numa relação de parasitismo complexa. Existem mais de vinte espécies de *Leishmania* e cada uma apresenta exigências ecológicas, vectores e hospedeiros diferentes [57].

A Leishmaniose apresenta três síndromas clínicas: leishmaniose cutânea, muco cutânea e visceral, esta última também conhecida como "Kala azar". A Leishmaniose Visceral (VL - *Visceral Leishmaniasis*) apresenta elevada taxa de mortalidade em humanos infectados e é considerada como um grave problema de saúde pública em vários países (ver Figura 1.7) [58].

A VL é causada por duas espécies, *Leishmania donovani* e *Leishmania infantum*, dependendo da área geográfica. *L. infantum* é responsável pela difusão da doença na Europa, norte de África e América Latina e infecta principalmente crianças e indivíduos imunossuprimidos. *L. donovani* infecta todas as faixas etárias e encontra-se difundida pelo leste de África e Índia. Após um período de incubação entre dois e seis meses, os pacientes infetados com VL apresentam sintomas e sinais persistentes de infeção que incluem febre, fadiga, fraqueza, perda de apetite e de peso. A proliferação do parasita para o sangue e sistema reticuloendotelial manifesta-se no aumento dos nódulos linfáticos, baço e fígado. Os sintomas persistem durante várias semanas e até meses antes que o paciente procure aconselhamento médico. A doença pode provocar a morte do paciente devido a infeções bacterianas, hemorragias graves ou anemia severa [59].

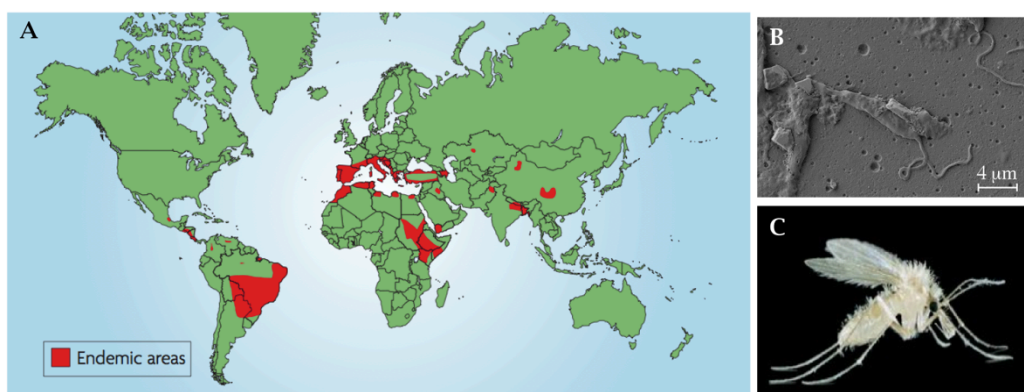


Figura 1.7: Mapa mundial das zonas onde a Leishmaniose Visceral é endémica (A) [59]. Imagem obtida por microscopia de varrimento electrónico de uma forma promastigota de *Leishmania* (B) e mosquito do género *Phlebotomus* responsável pela transmissão dos parasitas (C) [57].

A doença é endêmica maioritariamente em países pouco desenvolvidos ou em regiões rurais remotas. Pacientes e familiares afetados pela VL veem o seu nível económico diminuir devido a custos diretos da doença, como custos de diagnóstico e tratamento, e custos indiretos, relacionados com fatores como perda do trabalho e habitação. Estima-se que por ano surjam 500.000 novos casos de VL e que a doença seja responsável pela morte de 50.000 pessoas anualmente, uma taxa que, entre as doenças parasitárias, apenas é ultrapassada pela malária [59].

Na bacia Mediterrânica os casos de Leishmaniose humana são mais comuns em crianças mas, com o aparecimento da SIDA, a Leishmaniose tornou-se uma complicação comum em adultos infetados com o HIV ou que se encontrem a tomar fármacos imunossupressores [57].

O diagnóstico e tratamento precoce da VL são considerados uma ferramenta essencial no controlo da doença. São essenciais não só para os pacientes como para a comunidade, pois os pacientes não tratados contribuem para a transmissão da doença. Sendo uma infecção zoonótica, também para a medicina veterinária estes componentes são de extrema importância, especialmente porque o cão é considerado o hospedeiro principal do parasita.

Como a apresentação clínica da VL não é específica, a necessidade de um teste que confirme quais os pacientes que devem receber tratamento é crucial. Estes testes deverão ser sensíveis, uma vez que a doença é fatal e as terapias atualmente disponíveis envolvem medicação tóxica. Por outro lado, tendo em conta as características dos locais endémicos da doença, os testes deverão também ser simples e económicos [59].

A detecção visual do parasita ao microscópio, apesar de ter uma elevada especificidade, depende da sensibilidade do tecido usado, implica a obtenção de biopsias potencialmente dolorosas (medula óssea, fígado e baço) e a disponibilidade de técnicos e equipamentos hospitalares especializados.

Os testes serológicos para a leishmaniose baseiam-se na detecção indireta, ou seja, na detecção de anticorpos anti-leishmania no soro dos pacientes infetados. Existem atualmente vários testes serológicos disponíveis para o diagnóstico da VL, tais como os baseados na imunofluorescência indireta (IFA) e em ensaios ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) que demonstram resultados precisos, mas não são práticos para utilização em meios não laboratoriais [60]. Dois testes serológicos foram especificamente desenvolvidos para utilização no terreno: o teste de aglutinação direta (DAT - *Direct Agglutination Test*) e o teste imunocromatográfico rK39 (ICT - *rK39-based immunochromatographic test*) [61]. O antígeno rK39 é uma repetição de 39 aminoácidos que faz parte de uma proteína do complexo *L. donovani*, que demonstrou excelente sensibilidade e especificidade no diagnóstico da VL (Figura 1.8) [62]. O ICT foi desenvolvido como um ensaio imunológico de fluxo lateral, formato bastante prático para uso POC.

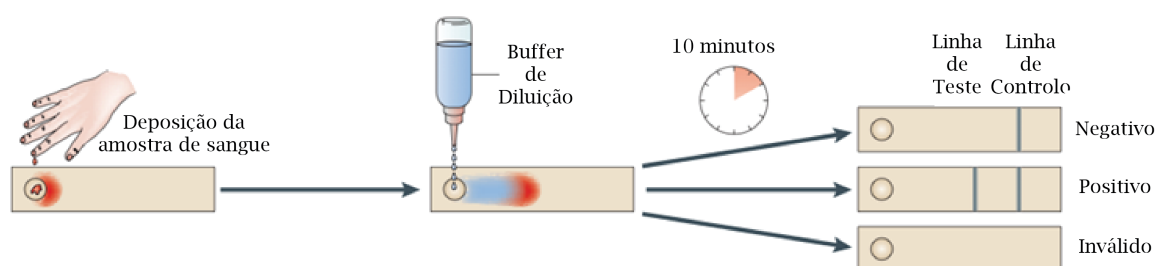


Figura 1.8: Teste de diagnóstico serológico imunocromatográfico com base no antígeno rK39 para Leishmaniose Visceral (adaptado de [59]).

O objetivo deste projeto, no que diz respeito ao biossensor para diagnóstico da Leishmaniose Canina, resume-se à implementação de um dispositivo de fluxo lateral que utiliza como suporte o papel. A substituição da membrana de nitrocelulose, usada nos sistemas comerciais, por papel visa a redução dos custos do produção, transporte e armazenamento dos testes, mantendo as propriedades que tornam este tipo de dispositivo simples e prático para uso no terreno. Pensa-se que as propriedades do papel poderão reduzir o número de componentes do dispositivo (ver Figura 1.9), nomeadamente, eliminando a necessidade de um suporte e encapsulamento plástico, uma vez que o papel é bastante mais resistente que a membrana de nitrocelulose, assim como pode ser adaptado para funcionar como bloco de depósito da amostra, de conjugação e de absorção, simultaneamente.

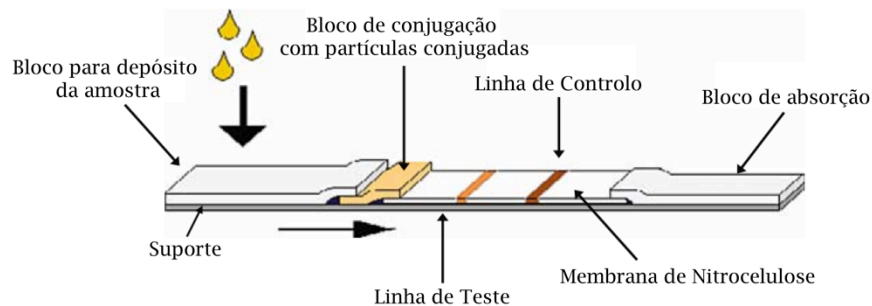


Figura 1.9: Componentes de um dispositivo de fluxo lateral (adaptado de [41]).

O dispositivo foi implementado usando como modelo a Leishmaniose canina e o seu funcionamento baseia-se na deteção indireta de anticorpos anti-*Leishmania* no soro de animais infetados, utilizando como transdutor nanopartículas de ouro funcionalizadas com proteína A. A proteína A estabelece uma ligação forte com a parte comum de todos os anticorpos de várias espécies, entre as quais se inclui o cão.

Técnicas de Caracterização

2.1 Microscopia electrónica de varrimento

A microscopia electrónica permite, através da interação entre um feixe de electrões altamente energético e a amostra, recolher informação morfológica sobre o material em estudo.

Existem três tipos principais de microscopia electrónica: varrimento, transmissão e emissão. A microscopia electrónica de varrimento (SEM do inglês *Scanning Electron Microscopy*) e de transmissão utilizam um feixe de electrões incidente na amostra para produzir uma imagem ampliada. Em microscopia electrónica de emissão a fonte de electrões é a própria amostra.

No decorrer do presente trabalho utilizou-se microscopia electrónica de varrimento para caracterizar diversos tipos de materiais. Esta técnica produz uma imagem altamente ampliada (desde 10 a 1000000 vezes) da superfície do material. A SEM permite ampliações muito maiores que a microscopia óptica pois utiliza um feixe de electrões cujo comprimento de onda ($\lambda_e = 0,012 \text{ nm}$) é muito inferior ao dos fotões de luz visível ($400 \text{ nm} < \lambda_{\text{visível}} < 700 \text{ nm}$). Outra vantagem da SEM é a profundidade de campo.

O microscópio electrónico de varrimento é constituído por fonte de electrões, sistema de lentes, bobinas de varrimento, colector de electrões e por um tubo de raios catódico. O funcionamento do SEM baseia-se no varrimento da superfície da amostra em observação pelo feixe de electrões. Quando os electrões penetram na amostra vão interagir com o meio causando a emissão de electrões e fotões da superfície. Podem-se distinguir três tipos de electrões: (i) electrões secundários, utilizados para formar a imagem da SEM convencional, (ii) electrões de Auger e (iii) electrões retro difundidos, que também podem ser utilizados para formar uma imagem. Os electrões emitidos em cada localização do feixe são detectados e utilizados para modular o brilho de um tubo de raios catódico (CRT, do inglês *Cathode Ray Tube*). Para cada ponto da amostra onde incide o feixe de electrões é feita a correspondência a um ponto do CRT. A imagem criada é sincronizada ponto a ponto com a amostra, ou seja, a cada coordenada bidimensional da amostra corresponde a mesma coordenada bidimensional da imagem criada. Assim, a ampliação resulta do processo de mapeamento e corresponde ao rácio entre a dimensão do CRT e a dimensão da porção da amostra percorrida pelo feixe.

O contraste em SEM depende de vários factores. Numa amostra uniforme não existe contraste. No entanto, se a amostra for constituída por materiais com diferentes números atómicos, pode ser observado contraste quando a imagem é obtida através de electrões retro difundidos, pois o coeficiente de retro difusão aumenta com o número atómico. Pelo contrário, o coeficiente associado à emissão de electrões secundários não é dependente do número atómico, ou seja, diferentes materiais não originam variações de contraste na imagem obtida por este processo. O factor que mais influencia o contraste em SEM é a topografia da superfície, uma vez que a interação do feixe de electrões com a

amostra aumenta com o comprimento do percurso percorrido, aumentando o coeficiente de emissão de electrões secundários [63-66].

Para caracterizar os materiais utilizados na realização deste trabalho foi utilizado o equipamento Carl Zeiss AURIGA Crossbeam SEM-FIB, representado na Figura 2.1. Utilizou-se o modo de electrões secundários para obtenção das imagens que permitem a caraterização morfológica dos materiais, com uma tensão de aceleração de 2,00 kV, abertura de diafragma de 30,00 μm e uma distância de trabalho entre a amostra e a coluna de SEM de cerca de 5 mm.



Figura 2.1: Equipamento Carl Zeiss AURIGA Crossbeam SEM-FIB usado na caraterização dos materiais.

2.1.1 Espectroscopia dispersiva de raios-X

Com SEM, para além de informação topográfica, é possível analisar a composição química da superfície do material, através Espectroscopia Dispersiva de Raios-X (EDS do inglês *Energy-Dispersive X-Ray Spectroscopy*).

O detetor EDS pode ser utilizado para detecção elementar no SEM. Os detetores do SEM produzem um sinal proporcional ao número de fotões raios-X detetados na área onde incide o feixe de electrões. Com EDS o sinal é exibido como um espectro de intensidade (número de fotões registados) em função da energia dos raios-X.

Os detetores podem ser ajustados de modo a passarem apenas uma gama de pulsos correspondentes ao pico de raios-X caraterístico de um determinado elemento. O resultado permite produzir uma imagem elementar ou um mapa de raios-X da amostra. Esta técnica está limitada à identificação de elementos de número atómico superior a $Z = 5$ (boro).

Os dados obtidos por EDS podem ser quantificados através do uso de referências elementares apropriadas e recorrendo a algoritmos computacionais.

Para a obtenção dos espectros EDS dos materiais estudados utilizou-se um detetor Oxford INCA x-act com uma tensão de aceleração de 15,00 kV e abertura de diafragma de 60,00 μm de modo a maximizar o sinal de raios-X emitidos pelas amostras.

2.2 Difração de raios-X

A difração de raios-X (DRX) é uma técnica utilizada para caracterizar estruturalmente um material com base na interação entre um feixe de raios-X e a geometria cristalina do material. Permite identificar diferentes estruturas cristalinas presentes num material e analisar as suas propriedades estruturais.

Um cristal é um material sólido, constituído por planos de átomos organizados, que formam um padrão tridimensional bem definido, a célula unitária. É um material que apresenta um arranjo periódico praticamente perfeito. Um material amorfo é, por oposição, um material que não apresenta qualquer periodicidade no arranjo atómico. Intermediamente pode-se classificar um material como policristalino quando é composto por diversos cristais microscópios, denominados cristallitos ou grãos.

Um feixe de raios-X, tal como a luz visível, pode ser descrito como uma onda electromagnética. A dispersão ocorre quando uma onda em movimento é forçada a desviar a sua trajetória devido a um conjunto de objetos dispersantes. A difração é essencialmente um fenómeno de dispersão que envolve a cooperação de um conjunto de átomos.

Numa estrutura cristalina os átomos encontram-se periodicamente organizados, pelo que os raios dispersados por este tipo de estrutura vão ter relações de fase bem definidas. Estas relações são de tal modo que geram interferência destrutiva na maior parte das direções da dispersão. Em raras exceções a interferência é construtiva, gerando raios difractados. A difração em geral ocorre apenas quando o comprimento de onda do feixe é da mesma ordem de grandeza da distância entre os centros dispersantes. Assim, considerando que os cristais são estruturas atómicas periodicamente organizadas e que os seus átomos agem como centros dispersantes, um cristal cuja distância interatômica é da mesma ordem de grandeza do comprimento de onda dos raios-X que nele incidem, vai difratar o feixe.

A interferência construtiva dos raios-X dispersados pelo cristal forma um pico de difração. A Lei de Bragg descreve o fenómeno de difração em termos da difração dos diferentes planos cristalinos e especifica as condições de interferência construtiva para planos espaçados de uma distância d_{hkl} :

$$n\lambda = 2d_{hkl} \sin \theta_{hkl} \quad \text{Eq. 2.1}$$

Onde λ é o comprimento de onda do feixe incidente, θ_{hkl} , denominado ângulo de Bragg, é o ângulo formado entre os planos atômicos e o feixe de raios-X incidente (e difractado) e n é o número de reflexão.

Experimentalmente a Lei de Bragg pode ser utilizada de dois modos diferentes. Utilizando um feixe de raios-X de comprimento de onda conhecido, obtêm-se o ângulo de Bragg a partir do qual é possível calcular a distância interplanar. Esta é a análise estrutural na qual se baseia o funcionamento do DRX. Outro modo consiste em determinar o comprimento de onda do feixe incidente, através da distância interplanar. Este método denomina-se espectroscopia de raios-X, e é utilizado na Fluorescência de raios-X, discutido seguidamente [63], [67], [68].

Foi utilizado o equipamento X'Pert Pro da PANalytical com uma ampola de cobre na configuração de Bragg-Brentano, representado na Figura 2.2. O padrão de difração foi adquirido para ângulos 2θ entre 10° e 85° com um passo de $0,02^\circ$ em 2θ .



Figura 2.2: Equipamento de difração de raios-X X'Pert Pro da PANalytical usado na caraterização dos materiais.

2.3 Fluorescência de raios-X

Quando um material é alvo de um feixe de raios-X com energia suficientemente elevada para ionizar uma orbital interna (nível K), o átomo vai recompensar preenchendo a orbital interna com um electrão de uma orbital mais externa (nível L ou superior) e consequentemente emitindo um fóton. O fóton emitido, radiação de fluorescência, tem energia característica que corresponde à diferença energética entre as duas orbitais envolvidas no processo. Esta radiação emitida forma um espectro de linhas que correspondem a comprimentos de onda específicos e característicos de um determinado elemento químico. Verifica-se que o comprimento de onda diminui à medida que o número atómico do elemento aumenta. As linhas mais intensas correspondem às camadas $K\alpha$ e $K\beta$, que são por isso denominadas linhas características.

É este fenómeno que está na base da análise por fluorescência de raios-X que permite, assim, uma análise química do material em estudo. A amostra, ao ser bombardeada por um feixe de raios-X, radiação primária, vai emitir radiação de fluorescência, secundária, que pode ser analisada por um espectrofotómetro. É usado um espectrofotómetro de raios-X que difrata a radiação fluorescente através de um cristal de distância interplanar conhecida. De acordo com a Lei de Bragg, apenas radiação de determinado comprimento de onda é difractada para cada posição angular. Assim, a intensidade de cada comprimento de onda pode ser medida por um detector apropriado.

A análise dos comprimentos de onda específicos, resultantes da radiação secundária emitida pelo material, permite a identificação dos elementos que o constituem (análise qualitativa). Esta técnica permite também uma análise quantitativa, caso a intensidade das linhas características do espectro emitido possa ser comparada com valores tabelados ou devidamente tratada.

A maior desvantagem associada a esta técnica reside no facto de estar limitada à detecção de elementos de número atómico superior a $Z = 11$.

A fluorescência de raios-X fornece uma análise qualitativa e quantitativa dos elementos que constituem o material sem dar qualquer informação sobre o seu estado de ligação ou estado físico. Por oposição, a difração de raios-X fornece informação sobre a estrutura e compostos presentes no material. Pode-se dizer que as técnicas se complementam [64], [67].

2.4 Espectroscopia do infravermelho por transformada de Fourier

A espectroscopia do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR, do inglês *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) é uma técnica de caracterização química que fornece informação sobre os grupos funcionais presentes no material.

A radiação infravermelha pertence ao espectro de radiação electromagnética e corresponde à região de número de onda entre 10 000 e 100 cm⁻¹. O seu comprimento de onda é maior que o da luz visível.

A radiação infravermelha é absorvida pela molécula, causando alterações no estado vibracional das ligações covalentes. Esta absorção é quantificada, mas a alteração do estado vibracional provoca alteração dos estados rotacionais circundantes. Por esta razão o espectro obtido é apresentado em forma de bandas.

De um modo geral existem dois tipos de vibração molecular: (i) estiramento (*stretching*), vibração ao longo do eixo da ligação, envolvendo alterações na distância de ligação e/ou na distância interatómica, e (ii) encurvamento (*bending*), que implica alterações no ângulo da ligação e/ou na posição relativa dos átomos na molécula. A frequência ou o comprimento de onda da radiação absorvida depende da massa relativa dos átomos, da constante de força da ligação e também da geometria dos átomos.

O princípio de funcionamento do FTIR está em determinar a atenuação que um feixe de radiação infravermelha sofre ao interagir com a amostra, em função da frequência, comprimento de onda, ou número de onda. O resultado é normalmente, um espectro de intensidade em função do número de onda, denominado espectro infravermelho.

O espectro infravermelho pode ser apresentado em função da transmitância ou da absorvância da amostra. Denomina-se transmitância (*Tr*) ao rácio entre a intensidade transmitida através da amostra (*I_t*) e a intensidade do feixe incidente (*I₀*).

$$Tr = \frac{I_t}{I_0} \quad Eq. 2.2$$

A absorvância (*A*) está relacionada com a transmitância segundo a Lei de Lambert-Beer.

$$A = -\log_{10}(Tr) \quad Eq. 2.3$$

Atualmente é usual apresentar o espectro infravermelho em função da absorvância, porque numa aproximação de primeira ordem, a Lei de Lambert-Beer permite de forma simples a análise quantitativa do espectro de infravermelhos. Ou seja, a absorvância é, numa aproximação de primeira ordem, função linear da concentração [69], [70], [63].

Quando a amostra se revela inapropriada para medição da transmitância, por exemplo por ser opaca, pode ser utilizada uma configuração que permita medir a refletância. Na configuração ATR (*Attenuated Total Reflection*) a interação entre o feixe e a amostra é realizada na interface entre a amostra e um cristal. O feixe infravermelho é direcionado através do cristal e, devido à alteração do índice de refração na sua superfície, o feixe é refletido para trás em vários pontos ao longo do comprimento do cristal, até finalmente sair para o detetor. Quando a amostra é colocada em contacto com a superfície do cristal, o feixe vai interagir com a amostra em diversos pontos [63].

Foi utilizado o equipamento Nicolet 6700 FT-IR da Thermo Electron Corporation com acessório ATR de cristal de diamante para obter o espectro infravermelho do substrato Whatman nº1 estudado. O equipamento pode ser observado na Figura 2.3.



Figura 2.3: Equipamento FTIR utilizado na caraterização dos substratos.

2.5 Análise Térmica

Análise Térmica (TA, do inglês *Thermal Analysis*) é um termo frequentemente usado para descrever métodos analíticos que descrevem o comportamento de amostras em função da temperatura.

Esta terminologia é abrangente pois pode ser utilizada para fazer referência a técnicas como Análise Gravimétrica (TG, do inglês *Thermogravimetry*), Calorimetria Diferencial de Varrimento (DSC, do inglês *Differential Scanning Calorimetry*) e Análise Térmica Diferencial (DTA, do inglês *Differential Thermal Analysis*).

Estas técnicas são muito usadas no estudo de materiais poliméricos pois fornecem informação sobre temperaturas de transição e decomposição características do material. As técnicas de TA não são experiências passivas, uma vez que propriedades estruturais da amostra, como morfologia ou cristalinidade, podem ser alteradas no decorrer da análise [71].

2.5.1 Análise Termogravimétrica

Análise Termogravimétrica é um ramo da análise térmica que estuda a alteração da massa de uma amostra em função da temperatura (modo de varrimento) ou do tempo (modo isotérmico). Nem todas as transições térmicas que os materiais sofrem implicam alteração da massa da amostra. Processos como fusão, cristalização ou transição vítrea não provocam alteração da massa da amostra. No entanto processos como absorção, dessorção, sublimação, vaporização, oxidação, redução e decomposição provocam mudanças na massa da amostra. Assim, a TG pode ser utilizada para caracterizar a decomposição e a estabilidade térmica dos materiais em diversas condições.

As curvas termogravimétricas são normalmente representadas como a variação de massa, expressa em percentagem, em função da temperatura ou tempo [71], [72].

2.5.2 Calorimetria Diferencial de Varrimento

A Calorimetria Diferencial de Varrimento é uma ferramenta analítica que permite caracterizar fisicamente as propriedades de um polímero. Possibilita a determinação das temperaturas de fusão, cristalização e de transições mesomorfas, bem como as entalpias e entropias correspondentes. Permite caracterizar a transição vítrea e outros efeitos que provocam alterações na capacidade calorífica ou no calor latente dos materiais.

A DSC combina as curvas de aquecimento e arrefecimento com os dados quantitativos da calorimetria. Os calorímetros diferenciais de varrimento são constituídos por dois suportes de amostra, um para a amostra em estudo e outro para a referência, vulgarmente um cadinho vazio ou com um material inerte. A temperatura é medida continuamente e a técnica diferencial é usada para determinar o fluxo de calor da amostra, igualando os ganhos de calor entre a referência e a amostra. A Calorimetria não é uma determinação direta do conteúdo de calor. O calor tem de ser medido desde a temperatura de conteúdo zero (zero Kelvin) e corresponde à soma de todos os incrementos obtidos até à temperatura de interesse. O conhecimento da capacidade calorífica e do calor das transições permite conhecer propriedades termodinâmicas do material, tais como energia térmica total, entropia e a estabilidade.

Muitos instrumentos de TA oferecem a capacidade de simultaneamente realizar ensaios de análise TG e DSC. A vantagem deste tipo de equipamento está no facto de as condições experimentais e da amostra serem idênticas, e permitindo a rápida obtenção de dados que podem ser comparados diretamente [71-74].

A análise térmica dos substratos de celulose foi efetuada em atmosfera de ar e cadinhos de alumínio, no intervalo entre 20 °C e 550 °C com uma taxa de aquecimento de 5 K/min. Na análise térmica da cera de impressão analisou-se o intervalo entre 20 °C e 400 °C com uma taxa de aquecimento de 5 K/min.

2.6 Ângulo de Contacto

Com o crescente aumento do uso de agentes de ativação de superfície, revestimentos protetores e especialmente com a evolução da tecnologia de impressão, uma atenção renovada tem sido focada nos fenómenos de *wettability*, ou seja, a capacidade de um material se molhar quando em contacto com um líquido. Correntemente o método mais usado na determinação desta propriedade é o ângulo de contacto.

O termo ângulo de contacto refere-se ao ângulo formado na interface de um sistema constituído por materiais com estados físicos distintos. O sistema de fases mais comum é gás-sólido-líquido, na qual se assume que a superfície de interação do sólido é plana. O ângulo de contacto é definido como a condição de fronteira na superfície sólida que incorpora as propriedades físicas que governam a forma da interface líquido-vapor.

Num sistema ideal, uma superfície sólida homogênea, a formulação clássica do balanço de forças na linha de contacto prevê o ângulo de contacto em termos da densidade energética das três interfaces do sistema. Este balanço é descrito pela equação de Young, que pode ser derivada minimizando a

energia mecânica do sistema para variações diferenciais das áreas de contacto das fases sólida, líquida e gasosa:

$$\cos(\theta_c) = \frac{\gamma_{SG} - \gamma_{SL}}{\gamma_{LG}} \quad \text{Eq. 2.4}$$

Onde θ_c representa o ângulo de contacto, γ_{SG} , γ_{SL} e γ_{LG} representam as tensões superficiais das interfaces sólido-gás, sólido-líquido e líquido-gás, respectivamente. Através da equação de Young é possível verificar que existe uma relação estreita entre o ângulo de contacto e a tensão superficial. Deste modo, para medir do ângulo de contacto, pelo menos uma das três tensões superficiais presentes na equação tem de ser conhecida.

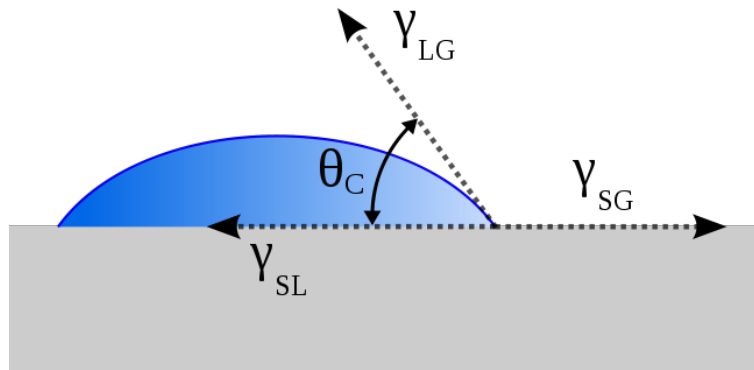


Figura 2.4: Relação entre o ângulo de contacto e a tensão superficial das diferentes interfaces (adaptado de [75]).

A energia de superfície das fibras de celulose e do papel é um parâmetro que afecta o seu desempenho em termos de penetração de líquidos e adesão a outros materiais poliméricos. Métodos que envolvem o ângulo de contacto, como o método da gota sessil ou o método de Wilhelmy, são os mais convenientes para determinação deste parâmetro.

As propriedades hidrófobas dos substratos estudados foram determinadas através do equipamento OCA 20 da Data Physics, representado na Figura 2.5.

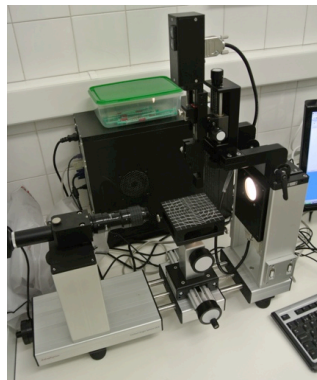


Figura 2.5: Equipamento OCA 20 da Data Physics utilizado na medição do ângulo de contacto dos substratos em estudo.

Com este equipamento é possível visualizar em tempo real a deposição do líquido sobre o substrato, permitindo a medição do ângulo de contacto no momento exato em que o líquido entra em

contacto com o substrato. O software do equipamento calcula o ângulo de contacto de acordo com a equação de Young apresentada anteriormente.

Se o ângulo de contacto for superior a 90° o substrato é considerado hidrofóbico, pois não se verifica uma boa adesão entre as superfícies dos materiais em contacto. Caso o ângulo encontrado seja inferior a 90° o substrato é hidrófilo, pois a adesão entre os materiais é favorecida.

Esta técnica foi utilizada na caracterização dos substratos e o líquido utilizado foi água destilada.

2.7 Porosimetria

A intrusão de mercúrio é uma técnica frequentemente utilizada como método de caracterização de materiais porosos, fornecendo parâmetros como porosidade, distribuição do diâmetro dos poros e densidade.

O princípio de funcionamento baseia-se no facto de o mercúrio não molhar a maioria dos materiais e, portanto, não penetrar nos poros por ação da capilaridade. Assim, para penetração ocorrer é necessário exercer pressão (P) em proporção inversa ao diâmetro do poro (D), de acordo com a equação:

$$D = \frac{-4\gamma \cos \theta_c}{P} \quad \text{Eq. 2.5}$$

O mercúrio líquido tem uma elevada tensão superficial (γ) e um elevado ângulo de contacto (θ_c). Na porosimetria de mercúrio, a amostra é inicialmente colocada em vácuo e cercada por mercúrio. Depois é aplicada pressão de modo a forçar o mercúrio a entrar nos espaços vazios. A quantidade de mercúrio que penetra no material é monitorizada. Obtém-se assim informação sobre o volume de mercúrio penetrante em função da pressão exercida, que pode ser convertida em diâmetro do poro através da equação 2.5. Um inconveniente desta técnica é o facto de assumir que os poros são cilíndricos.

A Porosimetria de mercúrio é também utilizada para medir a densidade aparente e a densidade de esqueleto. A densidade aparente é definida como o peso por unidade de volume de um material após a subtração do volume dos poros maiores. A densidade de esqueleto é determinada após a subtração do volume de todos os poros maiores que os medidos no valor máximo de pressão para a qual foi assinalada intrusão de mercúrio [76].

No decorrer deste trabalho utilizou-se o porosímetro de mercúrio AutoPore IV da Micromeritics, representado na Figura 2.6, para determinar o diâmetro e volume dos poros do substrato selecionado. A realização desta técnica foi possível devido ao interesse e colaboração do Departamento de Engenharia Civil da FCT-UNL.



Figura 2.6: Porosímetro de mercúrio AutoPore IV da Micromeritics usado para determinar o diâmetro médio dos poros do papel Whatman nº1.

Materiais e Métodos Experimentais

3.1 Materiais

Para o desenvolvimento deste projeto foram inicialmente estudados cinco substratos diferentes, com o intuito de escolher o substrato com as características que potenciem o funcionamento dos biossensores. Os substratos analisados foram (i) papel de cromatografia Whatman nº1 (Whatman Internacional Ltd., Florham Park, NJ), (ii) papel de impressão branco Xerox Performer (Xerox Corporation, Norwalk, CT, USA), (iii) papel de impressão reciclado Cópia 2000, (iv) papel de filtro de café Silvex nº4 (Silvex - Indústria de Plásticos e Papéis, SA, Lisboa, Portugal) e (v) membrana de nitrocelulose. A membrana de nitrocelulose, substrato vulgarmente utilizado no fabrico de dispositivos de fluxo lateral, foi avaliado a título de comparação, uma vez um dos principais objetivos do presente trabalho é a utilização do papel como substrato para a condução dos fluídos.

Para o estudo da ação capilar e propriedades hidrófilas dos substratos, bem como da eficácia das barreiras de cera desenvolvidas, foram usados corantes alimentares (Globo), que permitem sinalizar o comportamento das soluções quando em contacto com os substratos.

Para a implementação do dispositivo para medição do pH de soluções foi utilizada uma solução indicadora universal de pH. De modo a testar o funcionamento dos dispositivos criados recorreu-se a diversas soluções aquosas de pH distintos, sintetizadas acidificando ou basificando água destilada com ácido clorídrico e/ou hidróxido de sódio.

Na execução do dispositivo que permite determinar a concentração de glucose em soluções, utilizaram-se 4-antipirina (reagent grade), 3,5-dicloro-2-hidroxibenzenosulfonato de sódio (ácido 3,5-dicloro-2-hidroxibenzenosulfónico) e iodeto de potássio para desenvolver os indicadores de oxidação. Foi utilizada uma solução enzimática preparada com glucose oxidase (*Aspergillus niger*, 215 Umg⁻¹), peroxidase (*Horseradish*, 52 Umg⁻¹) e D-(+)-trehalose desidratada (*Saccharomyces cerevisiae*, >99%), numa solução tampão de fosfato a pH 6. Para estudar o funcionamento dos dispositivos desenvolvidos prepararam-se soluções com diferentes concentrações molares de D-(+)-glucose ($\geq 99,5\%$). Todos os reagentes referidos em cima foram adquiridos na Sigma-Aldrich Co., Spruce Street, St. Louis, MO USA.

Para a implementação do dispositivo para diagnóstico de Leishmaniose canina, utilizou-se uma solução de antígeno, feita a partir de uma cultura de *Leishmania infantum* que é mantida no Laboratório Nacional de Investigação Veterinária (LNIV), uma solução de anticorpos anti-cão produzidos em coelho e uma solução de proteína A marcada com nanopartículas de ouro, ambas adquiridas na Sigma-Aldrich Co., Spruce Street, St. Louis, MO USA. Para testar o funcionamento dos dispositivos fabricados utilizaram-se soros de cães infetados com Leishmaniose canina e soros de cães não infetados, fornecidos pelo LNIV. Foi também utilizada uma solução tampão na realização dos testes. A solução salina tamponada com fosfato (PBS do inglês *Phosphate Buffered Saline*) foi também fornecida pelo LNIV.

Na realização deste trabalho foi utilizado diverso tipo de material laboratorial como micropipetas, material de vidro, material de corte preciso, placa de aquecimento (Heidolph MR Hei-Tec, Schwabach, Germany), exsiccador, bomba de vácuo, entre outros.

Para além do equipamento necessário às técnicas de caracterização, foi utilizada uma impressora Xerox ColorQube 8570 (Xerox Corporation, Norwalk, CT, USA) e um microscópio óptico Olympus BX51 (Olympus Corporation, Tóquio, Japão). Vários resultados foram digitalizados para análise posterior utilizando o equipamento HP Deskjet F4580.

3.2 Preparação do substrato

O papel Whatman nº1, adquirido na forma de folhas de tamanho 570 x 460 mm, foi cortado em folhas de tamanho standard A5 (210 x 148 mm). A nitrocelulose foi obtida em rolo, armazenada entre duas folhas de papel protetor. Como se trata de um substrato bastante frágil a sua impressão foi feita com o auxílio de uma folha de papel normal, de tamanho standard A5. De modo a evitar problemas de impressão, fixou-se a nitrocelulose à folha auxiliar com fita-cola transparente. Para a impressão em papel de filtro de café utilizou-se o procedimento descrito para a nitrocelulose, uma vez que o seu formato impediu que fosse diretamente alimentado à impressora. O papel branco e o papel reciclado foram adquiridos na forma de folhas de tamanho A4 (297 x 210 mm).

Todos os substratos mencionados foram conservados em ambiente seco e não foram submetidos a mais nenhum tratamento antes de serem utilizados.

3.3 Fabricação dos dispositivos

A fabricação dos dispositivos inclui cinco fases distintas: (i) desenho dos padrões de cera hidrofóbicos, (ii) impressão a cera dos padrões desenhados, (iii) difusão dos padrões de cera por toda a espessura do substrato, (iv) deposição dos reagentes e (v) encapsulamento (ver Figura 3.1).

Os padrões foram desenhados com o auxílio do software Adobe Illustrator (Adobe Systems, Inc.), um programa de desenho vectorial intuitivo, que permite usar o sistema métrico para definir as dimensões das estruturas desenvolvidas.

Para a impressão utilizou-se a impressora Xerox ColorQube 8570 (Figura 3.2 A), que foi produzida de modo a usar como tinta blocos de cera sólida. A cera é sólida a temperatura ambiente mas tem um ponto de fusão relativamente baixo. A impressora aplica calor de modo a fundir a cera e criar os padrões que são depois transferidos para a superfície do substrato.

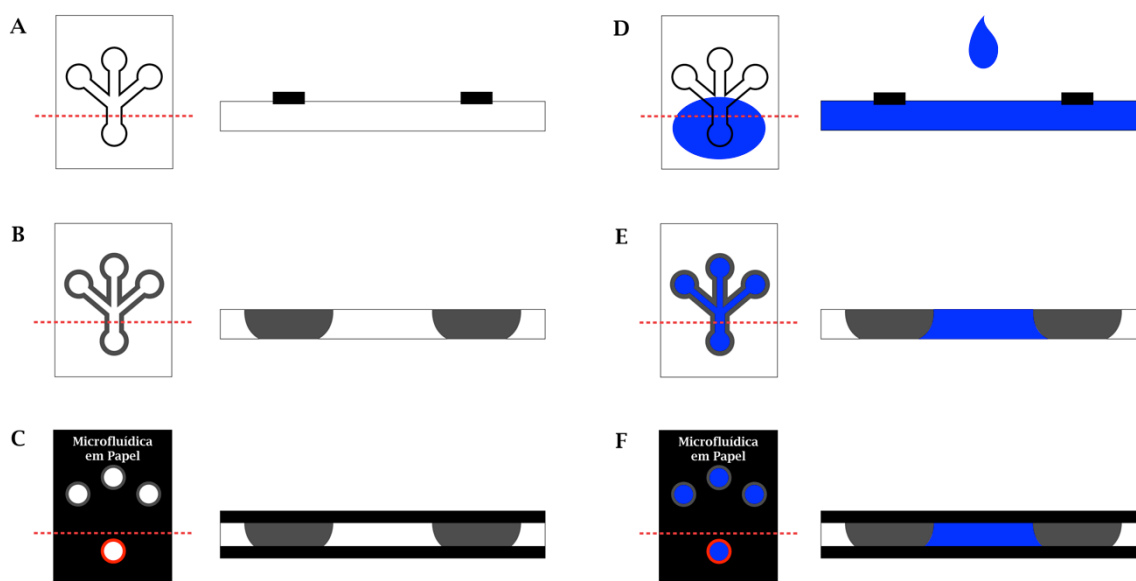


Figura 3.1: Esquema representativo das etapas de impressão (A), difusão da cera (B) e encapsulamento (C). Efeitos de cada etapa na condução de soluções pelo substrato (D), (E) e (F), respectivamente.

Utilizou-se uma placa térmica (Figura 3.2 B) para aplicar o calor necessário à difusão da cera impressa na superfície do substrato por toda a sua espessura. Este método permite criar barreiras hidrofóbicas capazes de delimitar canais hidrófilos por onde se deslocam soluções aquosas.

Os canais hidrófilos assim gerados têm a sua altura definida pela espessura do papel e largura igual à distância entre as barreiras de cera que os delimitam.

Seguidamente, com a ajuda de uma micropipeta, foram depositados os reagentes necessários ao desenvolvimento das reações colorimétricas específicas para cada um dos dispositivos em estudo.

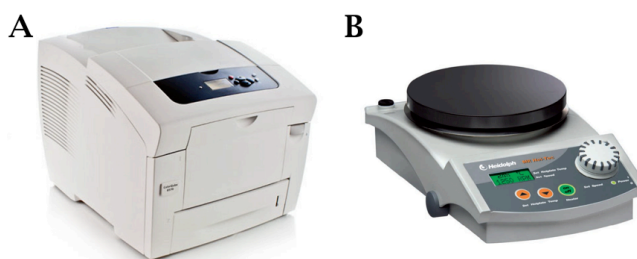


Figura 3.2: Impressora de tinta sólida Xerox ColorQube 8570 (A) e placa de aquecimento Heidolph MR Hei-Tec (B).

Após a secagem dos reagentes, foram impressas as camadas de encapsulamento. Para a impressão foi novamente utilizada a impressora Xerox ColorQube 8570.

Para acelerar o processo de secagem e fixação dos reagentes foi utilizada uma placa de aquecimento com sistema de vácuo incorporado.

3.4 Determinação da resolução do método

Para estudar o processo de difusão da cera no papel, quando exposta a uma fonte de calor, foram avaliadas barreiras geradas a partir de linhas com larguras nominais entre 100 e 700 μm , com incrementos de 100 μm .

A largura das barreiras foi medida (i) após impressão, após a difusão na (ii) frente e (iii) verso do substrato. As medições foram feitas através de fotografias obtidas por microscopia óptica com câmara fotográfica incorporada. O software Image J permite a medição de estruturas nas imagens, utilizando a escala incorporada na imagem para calibrar a relação comprimento/pixéis.

A difusão da cera no papel é potenciada pelo fluxo capilar em materiais porosos, fenómeno descrito pela equação de Washburn [14]:

$$d = \sqrt{\frac{\gamma D t}{4\eta}} \quad \text{Eq. 3.1}$$

Onde d é a distância que o líquido, de viscosidade η e tensão superficial γ , penetra num material poroso com um poro médio D , no tempo t . O comprimento da barreira hidrofóbica encontra-se então relacionada com o comprimento do padrão impresso através da seguinte equação:

$$L = L_i + 2d \quad \text{Eq. 3.2}$$

Onde L é a largura da barreira após difusão, L_i é a largura da linha impressa e d é a difusão lateral, ou seja, a distância que a cera difunde durante o processo de aquecimento. A difusão lateral é medida perpendicularmente ao eixo da linha e a partir da sua fronteira, como se pode ver no esquema apresentado na Figura 3.3.

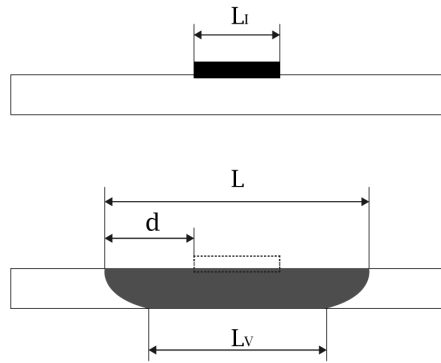


Figura 3.3: Esquema representativo da difusão da cera.

Experimentalmente, a difusão lateral foi determinada através da diferença entre a largura da barreira hidrofóbica e a largura da linha impressa:

$$d = \frac{L - L_i}{2} \quad \text{Eq. 3.3}$$

Segundo a equação de Washburn, a difusão derivada da capilaridade em materiais porosos é dependente do tempo do processo e da temperatura, uma vez que a viscosidade é função da temperatura. De modo a avaliar a influência do tempo e temperatura na largura da barreira hidrofóbica, um conjunto de linhas com larguras nominais (L_N) entre 100 e 700 μm , foram submetidas a diversos processos de difusão com temperaturas e tempos distintos. Como a cera tem um ponto de fusão $T = 80\text{ }^\circ\text{C}$, foram utilizadas temperaturas entre $80\text{ }^\circ\text{C}$ e $160\text{ }^\circ\text{C}$, com incrementos de $20\text{ }^\circ\text{C}$. Cada

temperatura foi avaliada para 1 e 2 minutos. Foi avaliada a influência do tempo e da temperatura na largura da barreira hidrofóbica na frente (L_f) e verso (L_v) do substrato.

Seguindo o mesmo procedimento, foi também avaliada a influência da orientação da impressão e da orientação do substrato. Para este estudo manteve-se constante o processo de aquecimento da cera. Utilizou-se 140 °C de temperatura durante dois minutos.

3.4.1 Largura da barreira

Depois de conhecer a largura das barreiras após o processo de difusão, foi necessário determinar quais destas barreiras delimitam o fluxo de soluções aquosas no interior do substrato. Desenharam-se as matrizes apresentadas na Figura 3.4, que foram testadas para cada uma das temperaturas e tempos de difusão em estudo.

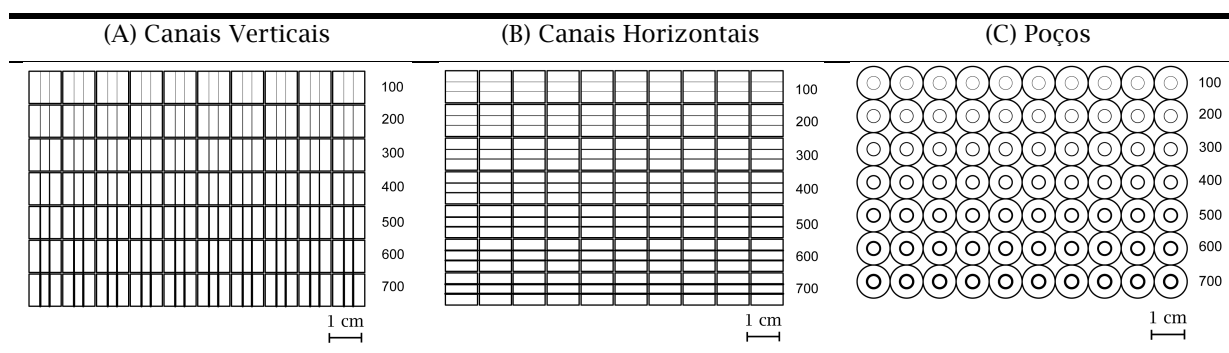


Figura 3.4: Matrizes de canais verticais (A), horizontais (B) e poços (C) utilizadas na determinação da largura da barreira hidrófoba.

As matrizes consistem numa série de dez canais delimitados por barreiras de largura nominal entre 100 e 700 μm . Estes canais encontram-se isolados por barreiras de 400 μm , que permitem a observação do seu comportamento individual. Foram analisados canais verticais (Figura 3.4 A), horizontais (Figura 3.4 B) e circunferências ou poços (Figura 3.4 C). O estudo de canais horizontais e verticais permitiu verificar a influência da orientação da impressão na eficácia das barreiras desenvolvidas através do método descrito.

Os ensaios foram efectuados recorrendo à utilização de um corante alimentar azul. Foram pipetados 10 μL em cada canal de uma solução de concentração 1:40 (v/v) de corante azul em água destilada. Foi avaliado se as barreiras retiam a solução até esta secar totalmente.

3.4.2 Largura do canal

A largura do canal, L_c , é a distância entre as duas barreiras hidrofóbicas que o delimitam. Para determinar a largura mínima do canal hidrófilo, ou seja, a largura mínima que permite o deslocamento de líquidos por capilaridade, testaram-se canais com diferentes larguras. Por uma questão de simplicidade de cálculo, definiu-se que o valor nominal destes canais corresponderia à distância entre os centros dos padrões hidrofóbicos, L_0 (ver Figura 3.5).

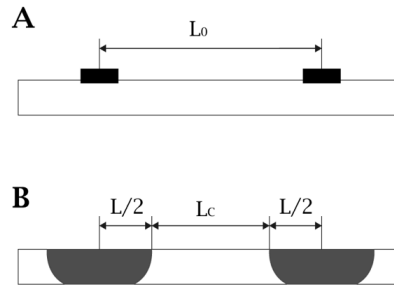


Figura 3.5: Esquema representativo do método utilizado na determinação da resolução do canal hidrófilo.

Deste modo o canal pode ser facilmente calculado através da expressão:

$$L_c = L_0 - L \quad \text{Eq. 3.4}$$

O estudo foi realizado para linhas de largura nominal $L_N = 400 \mu\text{m}$ e $L_N = 600 \mu\text{m}$ para um processo de aquecimento específico de temperatura 140°C e duração de 2 minutos. Este estudo teve como objetivo determinar a largura mínima L_0 que permite a delimitação de um canal hidrófilo. Considerou-se também a influência da orientação da impressão no estudo.

3.5 Preparação dos dispositivos para as aplicações desenvolvidas

3.5.1 Dispositivo para medição do pH de soluções aquosas

O dispositivo para medição do pH de soluções aquosas foi implementado como descrito na Figura 3.6.

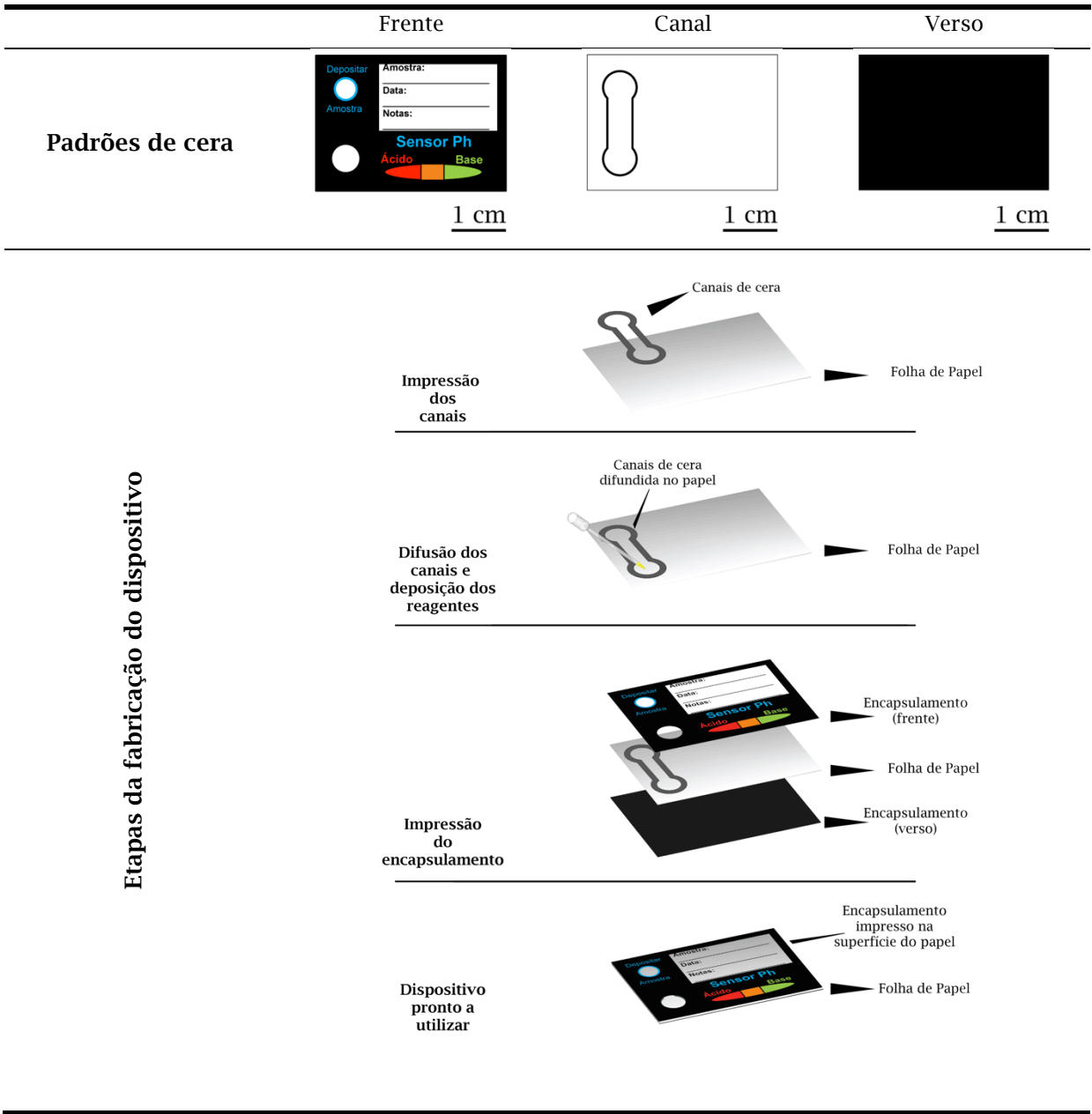


Figura 3.6: Desenho dos padrões e esquema das etapas de fabricação do dispositivo para medição do pH de soluções aquosas.

Antes da impressão das camadas de encapsulamento foram depositados, na zona de teste 2 µL de solução indicadora universal de pH.

Os dispositivos foram testados utilizando três soluções aquosas de pH = 1, 7 e 12. Foram pipetados 20 µL da solução a ser testada para a zona de deposição da amostra.

Os resultados colorimétricos foram analisados visualmente e comparados com a escala colorimétrica incorporada no encapsulamento.

3.5.2 Dispositivo para medição do nível de glucose de soluções

O dispositivo para determinação da concentração de glucose em soluções foi implementado conforme descrito na Figura 3.7.

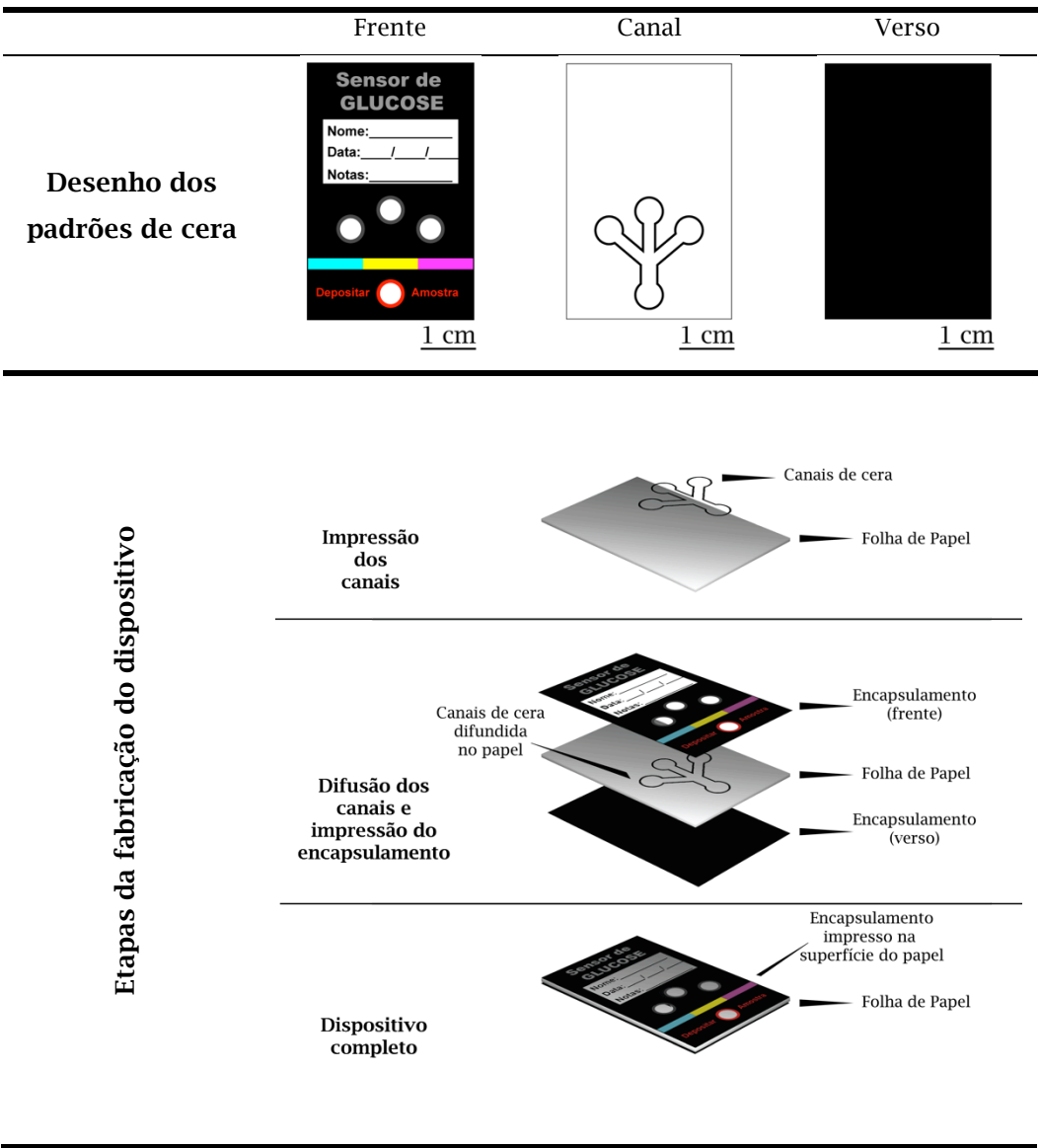


Figura 3.7: Desenho dos padrões e esquema das etapas de fabricação do dispositivo para determinação da concentração de glucose em soluções.

Em cada zona de detecção foi depositado 1 μL de cada indicador de oxidação/redução conforme o esquema da Figura 3.8.

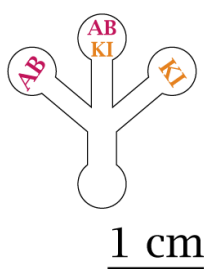


Figura 3.8: Disposição dos indicadores no biossensor de glicose.

O indicador denominado AB corresponde a uma mistura de rácio molar de 1:2 de 4-antipirina e 3,5-dicloro-2-hidroxibenzenosulfonato de sódio (ácido 3,5-dicloro-2-hidroxibenzenosulfónico), com concentrações 4 mM e 8 mM, respetivamente. O indicador KI foi assim denominado por corresponder à fórmula química do reagente que o compõe, iodeto de potássio, e foi preparado com uma concentração de 0,5 M.

Após secagem dos indicadores foi adicionado 1 μL de solução de enzimas a cada uma das zonas de detecção. A solução de enzimas foi preparada com glucose oxidase (645 U ml^{-1}), *Horseradish* peroxidase (339 U ml^{-1}) e 0,3 M de trehalose, em solução tamponada de fosfato de potássio de concentração 0,1 mM e pH 6. De acordo com estudos anteriores, a trehalose é adicionada à solução de enzimas como estabilizador proteico, reduzindo a sua desnaturação durante o armazenamento [77].

Após cada deposição o papel foi incubado à temperatura ambiente (cerca de 22 °C) durante 15 minutos, permitindo a secagem dos reagentes.

Para testar os dispositivos desenvolvidos foram preparadas soluções com concentrações molares de glucose padrão, que se encontram discriminadas na Tabela 3.1.

Tabela 3.1: Concentração molar de glucose para cada nível padrão de solução artificial.

Nº	Concentração Glucose (mM)	Nº	Concentração Glucose (mM)	Nº	Concentração Glucose (mM)
0	0,00	5	1,0	10	20
1	0,01	6	1,5	11	30
2	0,05	7	3,0	12	40
3	0,10	8	5,0	13	50
4	0,50	9	10	14	100

As 14 soluções padrão e uma solução tampão foram utilizadas para calibrar a resposta do biossensor a diferentes concentrações de glucose. O volume de solução padrão colocado na zona de depósito foi determinado como o volume mínimo capaz de preencher totalmente a área delimitada pelas barreiras de cera hidrófobas. Os resultados foram analisados visualmente e digitalizados para serem tratados com o software de análise de imagem Image J.

3.5.3 Dispositivo para diagnóstico de tuberculose - *Gold on Paper*

O dispositivo para diagnóstico de tuberculose foi implementado numa microplaca de papel (Figura 3.9). Este dispositivo foi desenvolvido em conjunto com o CIGMH da FCT-UNL, em que a componente da optimização e caracterização dos materiais e da impressão das microplacas foi desenvolvida no CENIMAT. Os procedimentos são apenas brevemente descritos aqui e informações mais detalhadas sobre este trabalho podem ser consultadas na publicação respetiva [27].

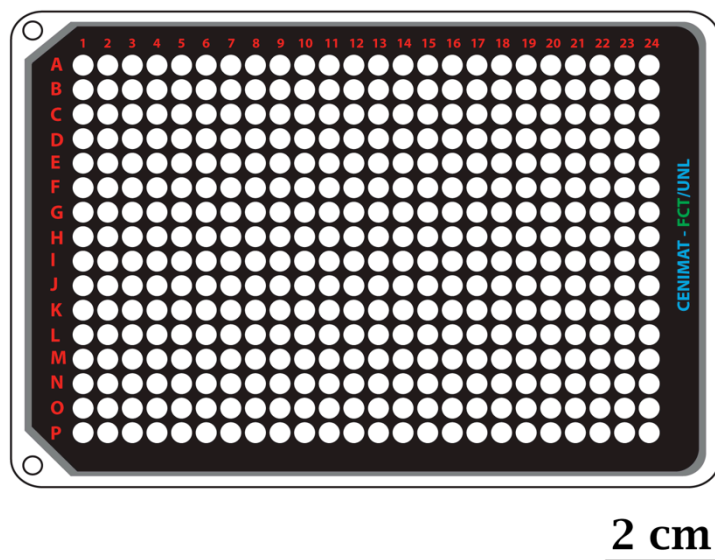


Figura 3.9: Desenho da microplaca standard de 384 poços para impressão.

A microplaca de papel representada na Figura 3.9 foi desenhada de modo a replicar as microplacas standard utilizadas em laboratório nas mais variadas aplicações. A exata replicação deste *layout* é importante uma vez que existem sistemas de leitura adaptados às dimensões standard das microplacas. As dimensões foram obtidas a partir de "Microzone Dimensions Guide, Compendium of Greiner Bio-one microplates" (Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, Germany), e teve-se em consideração difusão lateral da cera de impressão, durante o processo de aquecimento, no desenho dos padrões.

Cada poço da placa de papel foi impregnado com 1 μL de uma solução de revelação constituída por 0,12 M de cloreto de magnésio (MgCl_2). Após secagem da solução, durante cerca de 10 minutos à temperatura ambiente, as placas de papel foram armazenadas em folha de alumínio até à sua utilização.

Uma reação de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) específica foi utilizada para amplificar um fragmento de 395 pares de bases da subunidade β da polimerase de RNA (*rpoB*) de *M. tuberculosis* que é um gene apropriado para identificar os membros do MTBC (*Mycobacterium tuberculosis Complex Species*). Este gene foi posteriormente utilizado como alvo no ensaio de deteção com nanosondas.

A amplificação por PCR foi realizada num volume final de 50 μL contendo 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 2,2 mM MgCl_2 , 200 mM de cada dNTP, 1 U de *Taq* ADN polimerase (Amersham Biosciences, GE Healthcare, Europe, GmbH) e 10 pmol de cada primer (P1 5'-GAG AAT TCG GTC GGC GAG CTG ATC C-3'; P2 5'-CGA AGC TTG ACC CGC GCG TAC ACC-3'). Envolveu 35 ciclos de desnaturação a 94 °C durante 45 segundos, *annealing* a 58 °C durante 45 segundos seguido de 45

segundos de extensão a 72 °C. A amplificação foi observada por electroforese em 1% gel de Agarose e confirmada por sequenciação direta utilizando a tecnologia Big Dye v3.1 Terminator (STABVIDA, Almada, Portugal).

Para testar o funcionamento do dispositivo foram isoladas amostras de ADN a partir de culturas de *M. tuberculosis* (alvo complementar) e não MTBC (alvo não complementar) para usar como amostra positiva e negativa, respetivamente. Como amostra não relacionada utilizou-se ADN isolado a partir de uma cultura de *Mycobacterium kansasii*, cuja sequência difere da sequência alvo por apenas um nucleótido.

As nanopartículas de ouro, com um diâmetro médio de 14 nm, foram sintetizadas pelo método de redução por iões de citrato, previamente descrito por Lee e Meisel [55]. A sonda específica para o MTBC 5'-thiol- GATCGC CTC CAC GTC C-3' (STABVIDA, Portugal) foi então utilizada para funcionalizar as AuNPs, como previamente descrito [78-80].

Para determinar a discriminação do alvo no ensaio de calibração usaram-se oligonucleótidos sintéticos não modificados, sequência MTBC 5'-GGA GAT TGG TTT TGA CGT TTA TGT GGA CGT GGA GGC GAT C-3' positivo (complementar) e sequência não MTBC 5'-GGA GAT TGG TTT TGA CGT TTA TGT GGA TCG CCT CCA CGT C-3' negativo (não complementar). Os dados de calibração foram utilizados para determinar a especificidade da sonda na presença de amostras de ADN.

Os produtos do PCR foram precipitados em etanol, ressuspendidos em água desionizada e utilizados para o ensaio com nanossondas. Cada ensaio colorimétrico foi realizado com um volume total de 30 µL, com uma concentração final de nanossondas de 2,5 nM em 10 mM de tampão de fosfato (pH 8), 0,1 M cloreto de sódio (NaCl) e ADN alvo com uma concentração final de 30 µg ml⁻¹ [78-80].

O ensaio envolve a comparação colorimétrica entre um branco (sem ADN), constituído por 10 mM tampão de fosfato (pH 8) e 0,1 M NaCl; uma sonda, constituído por 10 mM tampão fosfato (pH 8); e as amostras.

Após 10 minutos a 95 °C para desnaturação do ADN do alvo, as misturas ficam em repouso durante 30 minutos à temperatura ambiente. Foi adicionado cloreto de magnésio (concentração de 0,02 M) à sonda de MTBC. Após 30 minutos a temperatura ambiente para revelação da cor, as misturas e o branco foram analisadas por espectroscopia UV/visível num leitor de microplacas (Tecan Infinite M200).

No ensaio com a placa de papel, um volume total de solução de reação de 5 µL foi utilizado com 2,5 nM nanossondas de ouro em 10 mM tampão de fosfato (pH 8), 0,1 NaCl e ADN do alvo com uma concentração final de 30 µg ml⁻¹. Após 10 minutos de desnaturação a 95 °C, as misturas estiveram em repouso durante 10 minutos a temperatura ambiente e foram depositadas nos poços da placa de papel. Após 45 minutos para revelação da cor, o papel foi fotografado com um telemóvel HTC Desire androide smartphone com câmara de 5 megapixéis (2592 x 1944 pixéis) e autofoco. As fotografias foram tiradas com luz branca artificial e sem flash. Os ensaios em branco foram utilizados para normalizar os dados às condições luminosas. Os dados adquiridos foram então analisados, sem mais nenhum tratamento, utilizando uma aplicação gratuita de análise RGB (ColorPikr, WiseClue) e transmitidos via ligação 3G para um computador onde foram analisados através do software ImageJ.

Cada ensaio foi repetido pelo menos três vezes e em quatro placas de papel diferentes.

Os resultados foram validados utilizando uma análise *one-way* ANOVA, com teste de comparações múltiplas de Tukey, através do GraphPad (San Diego, CA, USA). A análise *one-way* da variância foi utilizada para testar as diferenças entre dois grupos de dados (branco, amostra MTBC, amostra sem

MTBC e não relacionada). Análise estatística adicional das diferenças foi desenvolvida utilizando o procedimento de comparações múltiplas de Tukey.

3.5.4 Dispositivo para diagnóstico da leishmaniose canina

O dispositivo para diagnóstico da Leishmaniose canina foi implementado conforme descrito na Figura 3.10.

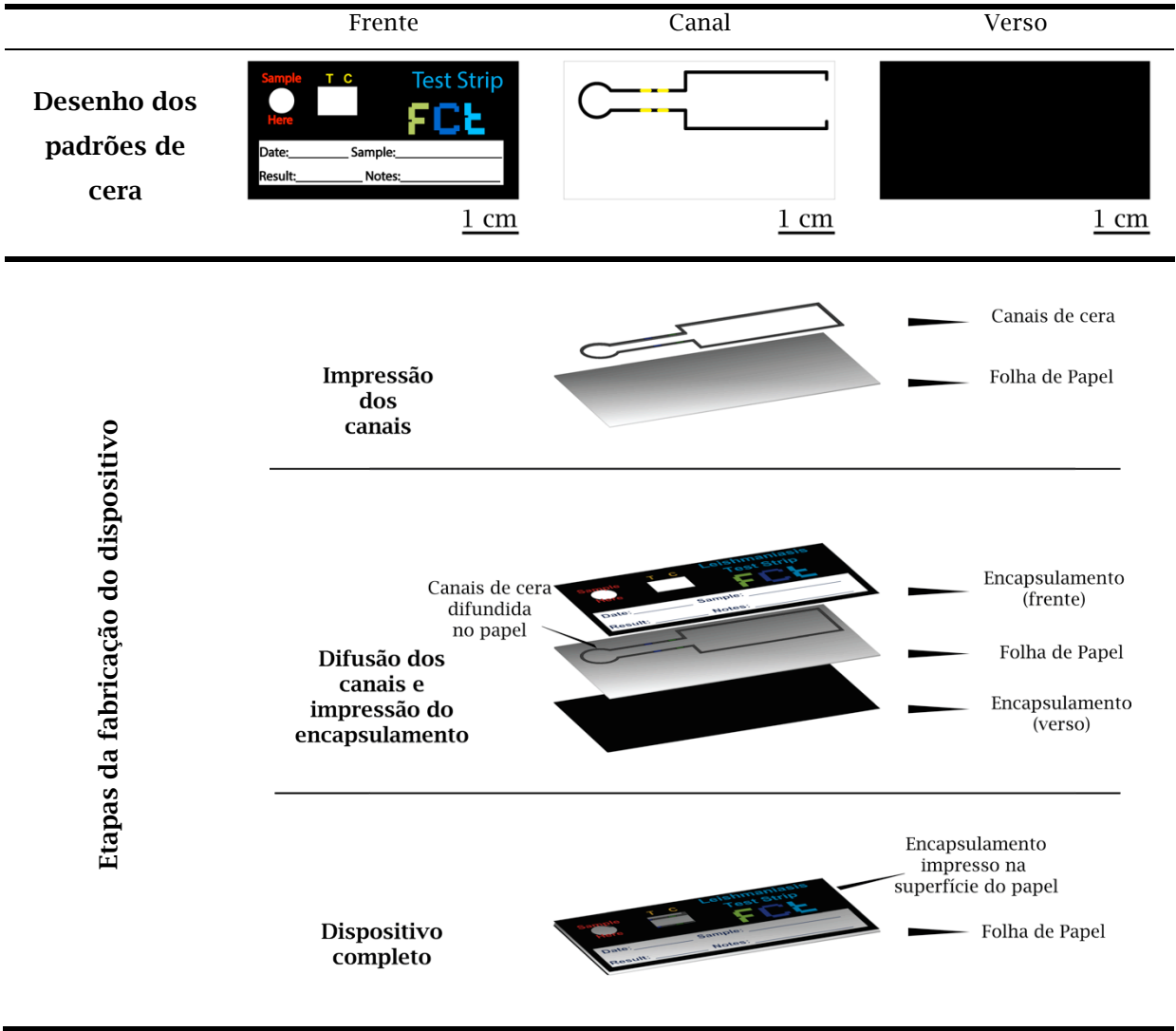


Figura 3.10: Desenho dos padrões e esquema das etapas de fabricação do dispositivo para diagnóstico da Leishmaniose canina.

O dispositivo foi implementado de modo a reproduzir a forma de um imunoensaio comercialmente disponível de fluxo lateral (LFA - *Lateral Flow Immunoassay*).

Como antígeno foi utilizado um extracto de promastigotos de uma estirpe de referência de *Leishmania infantum*, cuja cultura é mantida no LNIV. Os parasitas foram recolhidos da cultura (20 mL) por centrifugação (1000 xg, 20 min) e lavados três vezes com PBS (pH = 7,2). O *pellet* foi ressuscitado num volume $V = 1,5$ mL de água, sonificado e centrifugado durante 30 min a 10 000 xg.

O sobrenadante foi recolhido e a concentração total de proteínas foi determinada por espectrofotometria (Nanodrop).

Uma alíquota de volume $V = 50 \mu\text{L}$ de antigénio foi depositada na linha de teste com a ajuda de um interruptor de fluxo (ver Figura 3.11). Utilizou-se uma placa de aquecimento com sistema de vácuo incorporado de modo a acelerar o processo de secagem. A incubação foi realizada a temperatura ambiente (cerca de 22°C).

Na linha de controlo foram depositados $5 \mu\text{L}$ de anticorpos anti-cão. Também para a linha de controlo se recorreu a um interruptor e a um sistema de vácuo para facilitar o processo de secagem.

O sistema de interruptores foi importante na concentração e precisão das linhas de teste e controlo. Permitem a deposição das soluções sem que estas se difundam para além dos limites (ver Figura 3.11).

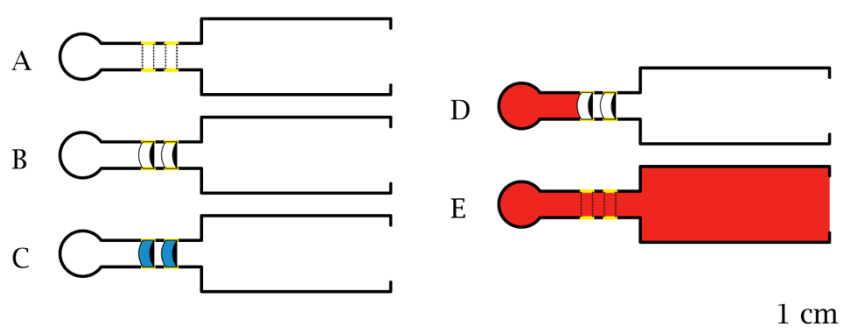


Figura 3.11: Sistema de interruptores de fluxo utilizados para depositar os reagentes nas linhas de teste e controlo do dispositivo para diagnóstico da Leishmaniose canina.

Os interruptores foram feitos através de cortes precisos com um bisturi (Figura 3.11 A). Os cortes são perpendiculares ao canal, desde a barreira superior até à barreira inferior. Seguidamente as linhas são levantadas, pressionando o verso do papel com um objeto rombo, interrompendo o contacto com o canal circundante (Figura 3.11 B). Nesta conformação são depositados os reagentes e é realizado o processo de incubação até estes estarem completamente secos (Figura 3.11 C). Este sistema interrompe o fluxo de soluções pelo canal (Figura 3.11 D), no entanto, quando são reposicionados o contacto é restabelecido e o fluxo é restaurado (Figura 3.11 E).

Após a secagem das soluções o dispositivo estava pronto a ser utilizado. Para fazer o teste foi colocada na zona de deposição da amostra uma solução constituída por $10 \mu\text{L}$ de solução 1:100 de soro de cão em água mais $10 \mu\text{L}$ de proteína A marcada com nanopartículas de ouro. Esta solução foi preparada antes da realização do teste e permaneceu em repouso durante cerca de 5 minutos antes da utilização.

Foram realizados testes utilizando soros de cães infetados com Leishmaniose canina e soros de cães não infetados. Os resultados colorimétricos foram analisados visualmente.

Apresentação e Discussão de Resultados

4.1 Caracterização dos substratos de celulose

O trabalho apresentado tem como objectivo a implementação de biossensores num substrato de celulose, de modo a produzir testes de diagnóstico rápidos, simples e económicos. O substrato é de extrema importância neste tipo de sensores, uma vez que tem um papel ativo no seu funcionamento. Não só permite o transporte de soluções biológicas até zonas de interesse, como deve permitir a fixação de compostos orgânicos, como proteínas, em regiões específicas. Assim, a seleção e caracterização do substrato a ser utilizado é essencial para o sucesso deste projeto.

Foram testados cinco materiais diferentes para selecionar qual o mais indicado à implementação dos dispositivos em estudo: (i) papel de cromatografia Whatman nº1, (ii) papel de impressão branco, (iii) papel de impressão reciclado, (iv) papel de filtro de café e (v) membrana de nitrocelulose, substrato vulgarmente utilizado em ensaios imunológicos de fluxo lateral.

Numa primeira abordagem foram analisadas algumas propriedades macroscópicas muito utilizadas na caracterização deste tipo de materiais, que se encontram discriminadas na **Error! Reference source not found.** O papel é normalmente descrito recorrendo a duas destas propriedades: a espessura e a gramagem, que representa a massa por metro quadrado. É possível fazer uma estimativa do volume total de poros relacionando a densidade das fibras de celulose ($\rho_{\text{fibra}} = 1540 \text{ kg/m}^3$) com a densidade do substrato, segundo a equação seguinte [7]:

$$\phi_{ar} = 1 - \frac{\rho_{\text{papel}}}{\rho_{\text{fibra}}} \quad \text{Eq. 4.1}$$

A porosidade do papel provém dos espaços entre as fibras, dos lúmens das fibras que não colapsaram no processo de fabrico do papel e da porosidade intrínseca das paredes das fibras.

Numa primeira análise verifica-se que macroscopicamente os papéis de impressão branco e reciclado apresentam propriedades idênticas. O papel de cromatografia Whatman nº1 é o que apresenta maior espessura apesar de não ser o mais denso. A densidade é a razão entre a gramagem e a espessura do material. Os papéis de impressão são os que apresentam maior densidade, no entanto, na avaliação deste resultado, deve-se tomar em conta que este tipo de papéis são normalmente fabricados com adição de compostos minerais, que melhoram as propriedades hidrofóbicas e aumentam a resistência, assim como reduzem os custos de produção. Estes compostos minerais, sendo relativamente mais pesados que as fibras de celulose, podem estar na origem dos elevados valores de densidade, não permitindo retirar conclusões sobre a quantidade de fibras de celulose por unidade de volume.

Tabela 4.1: Propriedades macroscópicas dos diferentes substratos estudados.

	Whatman	Branco	Reciclado	Café	Nitrocelulose
Gramagem (g/m^2)	88	80	80	51	56
Espessura (μm)	180	104	104	125	125
Densidade (kg/m^3)	489	769	769	408	448
Porosidade (%)	68,2	50,06	50,06	73,5	-
Poros Médio (μm)	11	-	-	-	0,45

Comparando o papel Whatman nº1 com o papel de filtro de café, verifica-se, que o primeiro apresenta maior densidade de fibras e consequentemente menor porosidade relativa. O papel filtro de café é o menos denso de entre os substratos estudados e consequentemente é o mais poroso. Em relação à porosidade dos papéis de impressão não se pode retirar muita informação uma vez que este tipo de papéis, como já foi mencionado, é fabricado com aditivos minerais e vulgarmente com tratamentos de superfície que não estão contemplados no método utilizado para calcular a porosidade relativa.

A nitrocelulose é o único substrato investigado que não tem fibras de celulose na sua constituição apesar de ser fabricado através de uma transformação química da celulose. Deste modo não foi possível calcular a porosidade relativa utilizando a equação referida. Apresenta uma espessura igual à do papel de filtro de café e uma densidade ligeiramente superior.

4.1.1 Microscopia electrónica de varrimento

A microscopia electrónica de varrimento permite observar a morfologia superficial dos substratos em estudo.

As fibras de celulose são a unidade estrutural do papel. São tubos ocos com cerca de 1,5 mm de comprimento e 20 μm de diâmetro e 2 μm espessura. Como o papel é formado por um processo de filtração, as fibras encontram-se maioritariamente orientadas no plano horizontal [7]. Devido a este facto é normal considerar o papel como uma rede bidimensional aleatória de fibras. Uma folha de papel típica contém cerca de dez fibras de espessura (plano vertical). De entre estas dez, cerca de metade estão, a determinada altura, expostas na superfície do papel. As restantes estão completamente dentro da estrutura fibrosa.

Nas figuras Figura 4.1, Figura 4.2, Figura 4.3, Figura 4.4 e Figura 4.5 podem-se observar as imagens obtidas por SEM dos diferentes substratos.

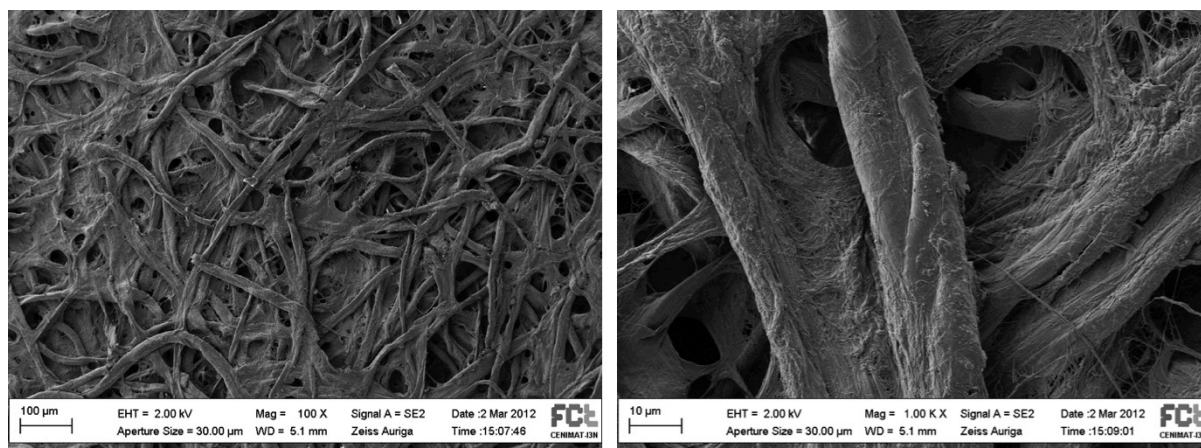


Figura 4.1: Imagens de SEM do papel Whatman n°1 com ampliação 100x (esquerda) e ampliação 1000x (direita).

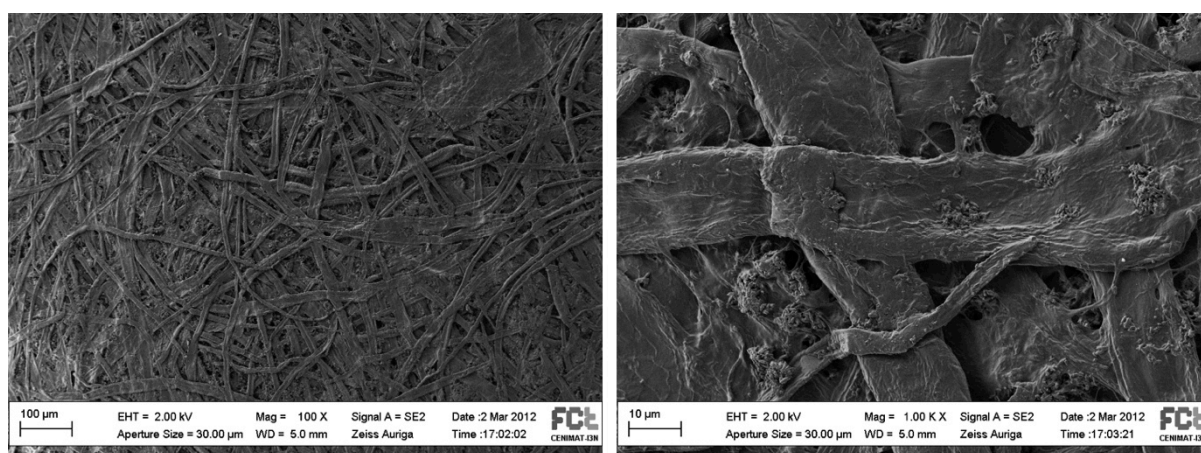


Figura 4.2: Imagens de SEM do papel branco com ampliação 100x (esquerda) e ampliação 1000x (direita).

Observando as imagens verificou-se que o elemento principal na constituição de todos os papéis em estudo é de facto uma malha tridimensional de fibras de celulose. Comparando os dois primeiros substratos confirmou-se, como demonstrado pelas propriedades macroscópicas, que o papel Whatman n°1 é mais poroso, apresentando maior quantidade de zonas profundas (mais escuras que as regiões superficiais), enquanto que o papel de impressão branco é mais compacto. Na imagem de maior ampliação do papel branco é possível observar aglomerados de partículas sobre e entre as fibras que são provavelmente aditivos minerais ou impurezas. As fibras do papel branco são mais achatadas que as do Whatman n°1 que apresentam geometria cilíndrica, factor que também aumenta a porosidade e a espessura do papel.

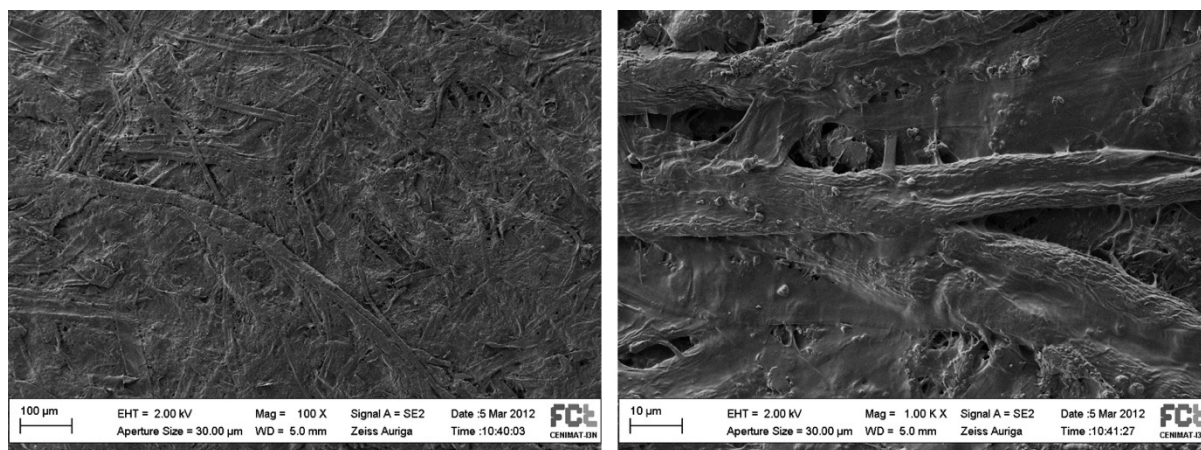


Figura 4.3: Imagens de SEM do papel reciclado com ampliação 100x (esquerda) e ampliação 1000x (direita).

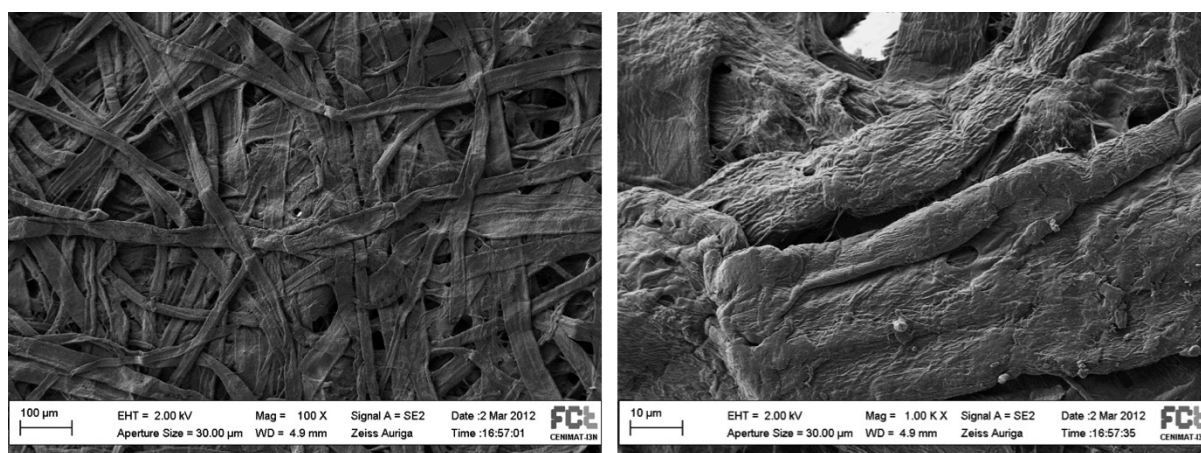


Figura 4.4: Imagens de SEM do filtro de café com ampliação 100x (esquerda) e ampliação 1000x (direita).

O papel de impressão reciclado apresenta uma morfologia de superfície mais homogênea, apesar de ser possível distinguir a rede fibrosa. Este papel apresenta um tratamento de superfície responsável pela uniformidade da superfície, aparentando uma porosidade bastante reduzida. Sendo fabricado a partir de fibras de celulose recicladas é possível assumir que a este tipo de papel são adicionados variados tipos de partículas, minerais, resinas e óleos de modo a formar um substrato resistente e com propriedades ótimas para impressão, compensando a qualidade das fibras já usadas [9], [81]. Na imagem de maior ampliação da Figura 4.3 é possível observar-se que existe de facto um material resinoso a revestir e unir as fibras assim como várias partículas depositadas sobre as fibras. Verifica-se também que sob esta camada superficial existem poros, levando a inferir que este tratamento superficial poderá não ser tão intenso no interior do substrato, revelando então uma estrutura porosa.

O papel filtro de café apresenta uma rede de fibras que formam uma estrutura porosa semelhante ao papel de cromatografia Whatman nº1, como se pode confirmar pelas propriedades macroscópicas listadas na Tabela 4.1. As suas fibras celulósicas são no entanto mais achatadas, à semelhança das que constituem o papel de impressão branco (Figura 4.2).

O substrato nitrocelulose, representado na Figura 4.5, possui uma morfologia completamente distinta dos outros substratos em consideração. A sua estrutura assemelha-se à estrutura de um coral, uma rede tridimensional porosa, com um aspecto consideravelmente mais homogêneo que os papéis analisados anteriormente. Apresenta estruturas cilíndricas de dimensões bastante inferiores que as fibras de celulose, e arranjadas tridimensionalmente sem uma aparente orientação específica. Estas

estruturas definem poros de diâmetro também bastante inferior e regular que os encontrados nos papéis estudados.

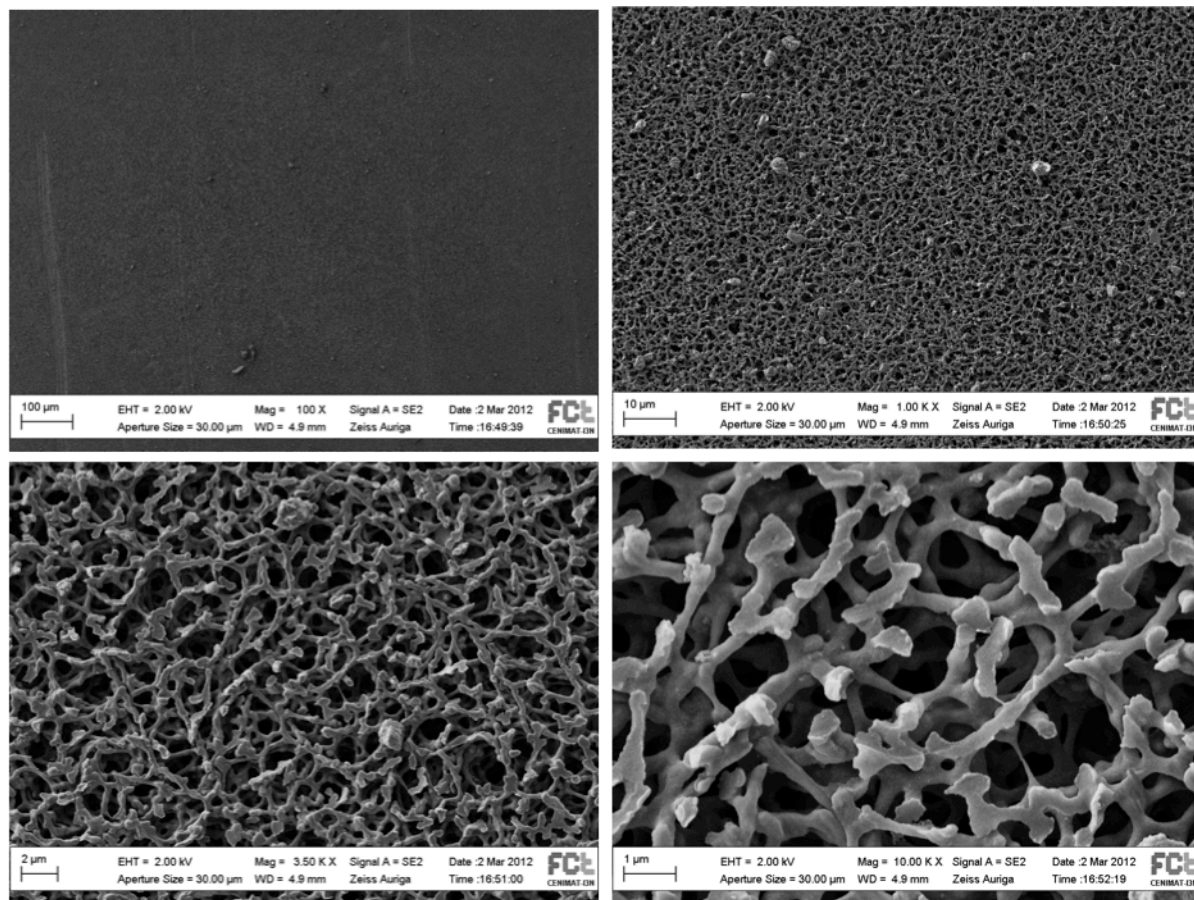


Figura 4.5: Imagens de SEM da Nitrocelulose com ampliação 100x (esquerda em cima), ampliação 1000x (direita em cima), ampliação 3500x (esquerda em baixo) e ampliação 10 000x (direita em baixo).

A espectroscopia Dispersiva de Raios-X fornece uma análise química elementar das amostras em estudo. É uma ferramenta do SEM que utiliza o feixe de electrões para excitar a amostra, levando à produção de radiação secundária específica e característica do elemento.

Na Figura 4.6 encontram-se os espectros obtidos de todos os substratos analisados em função da energia da radiação secundária emitida pelos elementos.

Numa primeira análise verifica-se que todos os substratos apresentam na sua constituição átomos de carbono, correspondente a uma energia $E = 0,277$ keV, e átomos de oxigénio, de energia $E = 0,525$ keV. Este é um resultado esperado, uma vez que todos os substratos são constituídos por fibras de celulose, que é um polissacarídeo, polímero de glucose. A nitrocelulose é obtida tratando fibras de celulose com ácido nítrico, originando a substituição de grupos hidroxilo por grupos nitrato.

É de notar a presença de um pico inicial, correspondente a $E = 0$, comum a todos os substratos. Este pico é característico do equipamento, não fornecendo qualquer tipo de informação sobre as amostras.

Verificou-se que o papel reciclado e o papel branco são os que apresentam maior variedade de elementos na sua constituição. A presença de alumínio e silício, identificados pelos picos de energia $E = 1,487$ e $E = 1,740$ keV respectivamente, levanta a suspeita da utilização do aditivo Kaolinite no fabrico destes papéis. A Kaolinite é um alumino silicato muito usado na indústria do papel como

aditivo, desde 1723, e como revestimento, desde 1870 [9]. Por outro lado, a detecção do elemento cálcio pode indicar a presença do aditivo mineral carbonato de cálcio, também muito usado no fabrico de papel. Este elemento, identificado pelos picos de energia $E = 3,692$ e $E = 4,013$, encontra-se também presente nos substratos Whatman nº1 e Nitrocelulose, apesar de em quantidades quase residuais. A existência dos aditivos mencionados na composição dos substratos será confirmada pela análise DRX, analisada na secção seguinte, através da identificação das suas estruturas cristalinas. Para além dos elementos mencionados foram detectadas quantidades residuais dos elementos sódio, cloro e enxofre na constituição dos papéis de impressão, identificados pelos picos de energia $E = 1,041$, $E = 2,622$ e $E = 2,308$ keV, respectivamente. No espectro da Nitrocelulose foi também encontrado o pico que corresponde a átomos de enxofre.

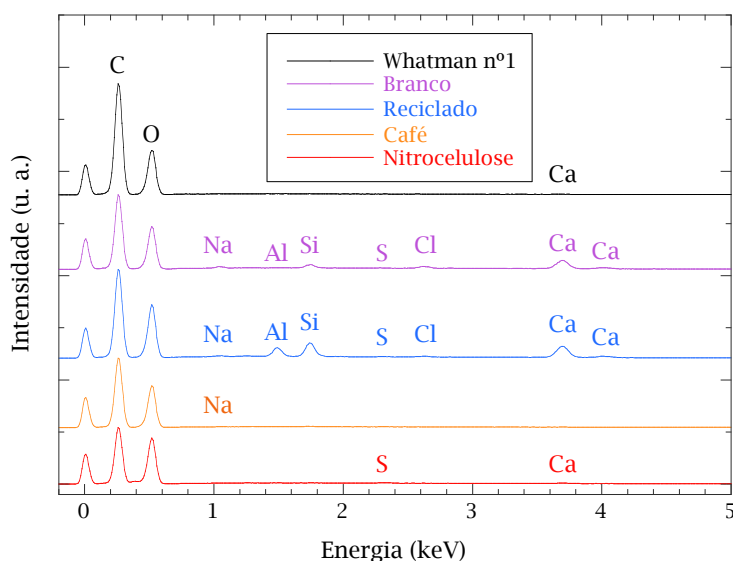


Figura 4.6: Espectros EDS dos substratos em estudo.

No espectro correspondente ao papel de filtro de café apenas foi detectado um pequeno pico de sódio, para além dos correspondentes ao carbono e oxigénio, provavelmente devido a contaminação da amostra.

A análise EDS não fornece informação sobre os compostos formados pelos elementos detetados. Deste modo a técnica tem de ser complementada com outras que permitam identificar os compostos presentes nas amostras em estudo. No entanto, pela análise das imagens SEM e correspondentes espectros EDS, concluiu-se que o papel de cromatografia Whatman nº1 e o papel de filtro de café são os mais puros, apresentando uma constituição maioritariamente de fibras de celulose.

4.1.2 Difração de raios-X

Os substratos em estudo foram analisados por difração de raios-X, de modo a identificar as diferentes estruturas cristalinas neles presentes. Os difratogramas obtidos encontram-se na Figura 4.7.

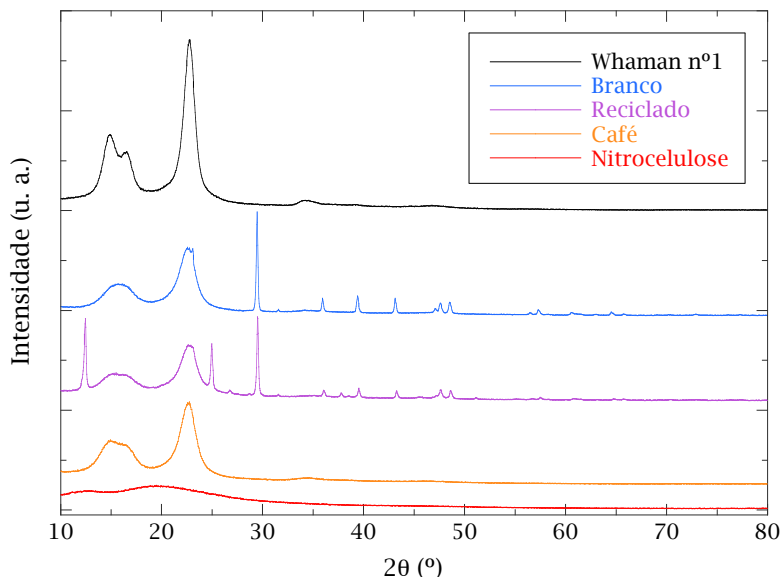


Figura 4.7: Difratogramas dos substratos em estudo.

Verifica-se que todos os substratos à exceção da nitrocelulose apresentam picos característicos da estrutura cristalina da celulose do tipo I. Como se pode observar na Figura 4.7, os papéis apresentam quatro picos de ângulos $14,8^\circ$, $16,5^\circ$, $22,6^\circ$ e $34,4^\circ$. Ao pico formado entre os ângulos $14,8^\circ$ e $16,5^\circ$ é atribuído o plano cristalográfico (101). Os ângulos $22,6^\circ$ e $34,4^\circ$ correspondem aos planos (002) e (004) ou (032), respectivamente. A celulose de tipo I tem uma geometria monoclinica P_{21} , cujos parâmetros de rede são $a = 8,3$, $b = 10,3$, $c = 7,9$ Å e $\beta = 84^\circ$ [82–84].

Quando o conteúdo de celulose é elevado, é possível distinguir os picos característicos de ângulos $14,8^\circ$ e $16,5^\circ$, como no caso do papel Whatman e do papel de filtro de café (ver Figura 4.7). Porém, quando as fibras de celulose contêm elevadas quantidades de materiais amorfos, como a lenhina e a hemicelulose, estes dois picos fundem-se, aparecendo como um único pico largo. Este fenómeno pode ser observado nos difratogramas do papel branco e papel reciclado [82].

Por observação da Figura 4.7 verifica-se que no papel Whatman e no papel de filtro de café apenas foi identificada a estrutura cristalina da celulose, uma vez não são visíveis mais picos para além dos previamente referidos. No papel branco e no papel reciclado são visíveis outros picos para além dos que caracterizam a estrutura da celulose. Em ambos os papéis foi identificado o composto carbonato de cálcio (calcite) que é um aditivo usual no fabrico de papel. A calcite é a forma mineral mais comum do carbonato de cálcio (CaCO_3) e é também a mais estável. Tem um papel importante na opacidade e brilho do papel, através da formação de aglomerados leves e porosos [9]. Este composto foi identificado através dos picos observáveis nos ângulos $2\theta = 29,47^\circ$, $39,49^\circ$, $47,52^\circ$ e $48,62^\circ$ que correspondem aos planos cristalográficos (104), (113), (018) e (116), respectivamente. Para além deste composto foi ainda possível identificar no papel reciclado o composto conhecido como Kaolinite. A Kaolinite é um silicato de alumínio com fórmula química $\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot 2\text{SiO}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, que é utilizado na produção

do papel com o objectivo de aumentar a opacidade do papel e melhorar as propriedades de impressão [9]. Este composto foi identificado pelos picos de ângulos $2\theta = 12,40^\circ$, $23,11^\circ$ e $24,94^\circ$, que correspondem aos planos cristalográficos (001), (10-1) e (002), respectivamente.

Estes resultados estão de acordo com a análise EDS, no que diz respeito ao papel reciclado. Neste substrato foram identificados por EDS elementos que correspondem à estrutura química da Kaolinite, alumínio e silício, e cálcio, constituinte do carbonato de cálcio. O carbono e o oxigénio, os outros constituintes da calcite foram também identificados, mas como são os principais elementos que constituem a molécula de celulose, a sua associação ao carbonato de cálcio não pode ser concluída com base na análise elementar. Na análise EDS do papel branco foram identificados os mesmos elementos. No entanto estes resultados não correspondem à identificação obtida por DRX, na qual não foi identificada a estrutura cristalina da Kaolinite. Observando o espectro resultante da análise EDS, Figura 4.6, verifica-se que os picos correspondentes aos elementos alumínio e silício deste substrato são quase residuais, pois apresentam um número muito inferior de contagens.

Na Figura 4.8 encontra-se representado o difratograma da nitrocelulose.

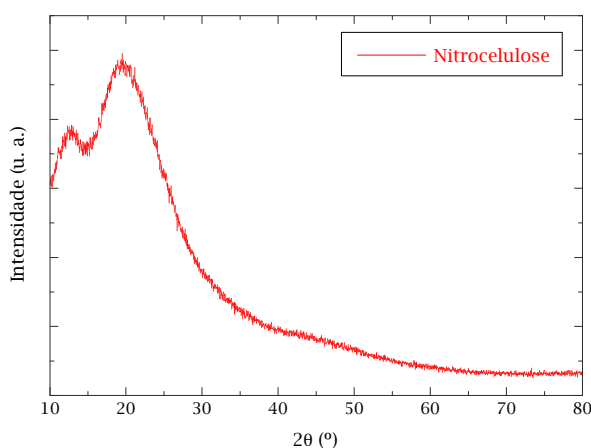


Figura 4.8: Difratograma da Nitrocelulose.

O difratograma da nitrocelulose representa uma estrutura com baixa cristalinidade, ou uma estrutura amorfa. Apesar de se notar, observando o gráfico da Figura 4.8, duas zonas distintas de maior intensidade de ângulos $2\theta = 12,5^\circ$ e 22° , recorrendo à Figura 4.7, percebe-se que estas zonas não podem ser identificadas como picos. Os picos resultantes da difração de raios-X por uma estrutura cristalina são bem definidos e estreitos. No entanto, é relevante notar que os ângulos referidos correspondem aos planos cristalográficos da celulose de tipo II.

O processo de fabrico da nitrocelulose envolve vários passos, entre os quais se distingue o tratamento ácido de fibras de celulose, com ácido nítrico e ácido sulfúrico, e posteriormente o tratamento com bicarbonato de sódio para eliminar o excesso de ácido [85]. Este tipo de tratamentos provocam alterações na estrutura da celulose levando à conversão de celulose tipo I para celulose tipo II [86].

O Índice de Cristalinidade (ICr) dos papéis estudados foi calculado de acordo com o método empírico de Segal, utilizando a equação:

$$ICr(\%) = \frac{I_{(002)} - I_{(am)}}{I_{(002)}} \times 100 \quad Eq. 4.2$$

Na qual $I_{(002)}$ representa a intensidade máxima do plano (002) da estrutura cristalina da celulose e $I_{(am)}$ representa a intensidade de difração da componente amorfa do material, que corresponde a uma ângulo $2\theta = 18^\circ$ [82]. Na Tabela 4.2 encontram-se os valores do índice de cristalinidade calculados para os diferentes substratos.

Tabela 4.2: Índice de cristalinidade dos diferentes substratos.

Substrato	Whatman	Branco	Reciclado	Café
Índice de Cristalinidade	86,3%	75,6%	70,1%	74,7%

Constata-se que o papel Whatman é o que tem maior índice de cristalinidade, enquanto que o papel reciclado é o que apresenta o valor mais baixo.

O índice de cristalinidade relaciona o pico cristalino da celulose com a curva amorfa do material. Durante a produção de papel, diversos tratamentos mecânicos e químicos são usados para purificar as fibras de celulose e eliminar materiais amorfos, como a lenhina e a hemicelulose. Estes processos podem alterar a estrutura das paredes das fibras, convertendo a celulose de tipo I para celulose de tipo II. Esta transformação resulta numa alteração das ligações de hidrogénio. Apesar de a estrutura de celulose de tipo II ser termodinamicamente mais estável, o seu índice de cristalinidade é inferior ao da celulose do tipo I [82], [83].

Apesar de se verificar alguma discrepância entre os índices de cristalinidade obtidos para os diferentes papéis, os valores de cristalinidade são elevados, confirmando que são maioritariamente constituídos por celulose do tipo I, identificada pelos picos característicos no difratograma. As pequenas discrepâncias observadas deverão estar relacionadas com o processo de fabrico, nomeadamente com o tipo de tratamentos efectuados e com a sua duração [83].

4.1.3 Fluorescência de raios-X

A fluorescência de raios-X é uma técnica de caracterização que permite identificar e quantificar quais os elementos químicos presentes no material em estudo. A técnica está limitada a identificar átomos de número atómico superior a $Z = 9$ (flúor). Assim, não é capaz de detectar átomos como carbono ($Z(C) = 6$), azoto ($Z(N) = 7$) ou oxigénio ($Z(O) = 8$). Estes elementos constituem a maioria dos átomos presentes no papel, uma vez que é um material orgânico. Tendo em conta esta limitação, a análise FRX foi realizada com o intuito de determinar quais os compostos inorgânicos presentes nos diferentes substratos.

Os resultados obtidos encontram-se discriminados nas tabelas seguintes. A Tabela 4.3 mostra as concentrações obtidas para os diferentes elementos químicos identificados nos diferentes substratos analisados. É importante realçar que as concentrações obtidas são função da massa dos elementos e compostos, e que estão normalizadas aos constituintes detectados. Portanto não é possível saber que percentagem do substrato é realmente constituída por estes elementos.

Observando a Tabela 4.3, conclui-se que o substrato com menor número de elementos químicos é o papel de cromatografia Whatman nº1. O papel reciclado é o que apresenta maior diversidade de

elementos na sua composição. Este resultado é esperado e justificado pelo facto de o papel reciclado ser fabricado usando como matéria-prima diferentes tipos de papéis pós consumo.

Tabela 4.3: Concentração dos elementos presentes nos substratos.

Elemento	Whatman	Branco	Reciclado	Café
Na	-	1,70	0,92	-
Al	-	0,11	7,40	-
Si	-	0,23	12,00	-
S	-	0,15	0,93	10,0
Cl	-	2,30	2,00	20,0
Ca	100	96,00	74,00	70,0
Ti	-	-	0,75	-
Mn	-	-	0,11	-
Fe	-	-	1,6	-
Sr	-	0,029	0,21	-
Total	100	100,52	99,92	100

O cálcio (Ca) e o cloro (Cl) são vulgarmente usados no processo de branqueamento e como aditivos na fabricação do papel [1], [9]. O cálcio está presente na constituição de todos os substratos analisados. Os substratos Branco, Reciclado e Café têm também compostos de cloro na sua constituição. Concluiu-se então que os substratos Whatman, Branco e Café foram submetidos a uma etapa de branqueamento. O papel reciclado em estudo é fabricado sem recorrer a agentes de branqueamento. No entanto, foi fabricado recorrendo a papéis usados que poderão ter sido submetidos a processos de branqueamento e junção de aditivos, justificando a presença destes compostos na sua constituição.

O papel branco é o que apresenta maior concentração relativa de cálcio e cloro, como esperado, uma vez que é também o papel mais branco.

4.1.4 Ângulo de contacto

Durante a produção do papel são introduzidos diversos aditivos específicos à finalidade de cada papel. Posteriormente, na produção da folha, são ainda efectuados tratamentos superficiais. O conjunto destas ações vai influenciar o ângulo de contacto entre a superfície de cada substrato e uma solução aquosa. A variação é de tal forma significativa que existem papéis hidrófobos e papéis bastante hidrófilos, ou seja, que repelem e têm afinidade com água, respectivamente. Os resultados obtidos encontram-se indicados na Figura 4.9.

O substrato que demonstrou ser mais hidrófilo foi o papel Whatman nº1, uma vez que apresentou menor ângulo de contacto. Por oposição o papel branco foi o que revelou ser mais hidrófobo,

apresentando o maior ângulo de contacto de entre todos os substratos estudados. O papel reciclado é também hidrófobo ao passo que o papel de filtro de café e a membrana de nitrocelulose são hidrófilos.

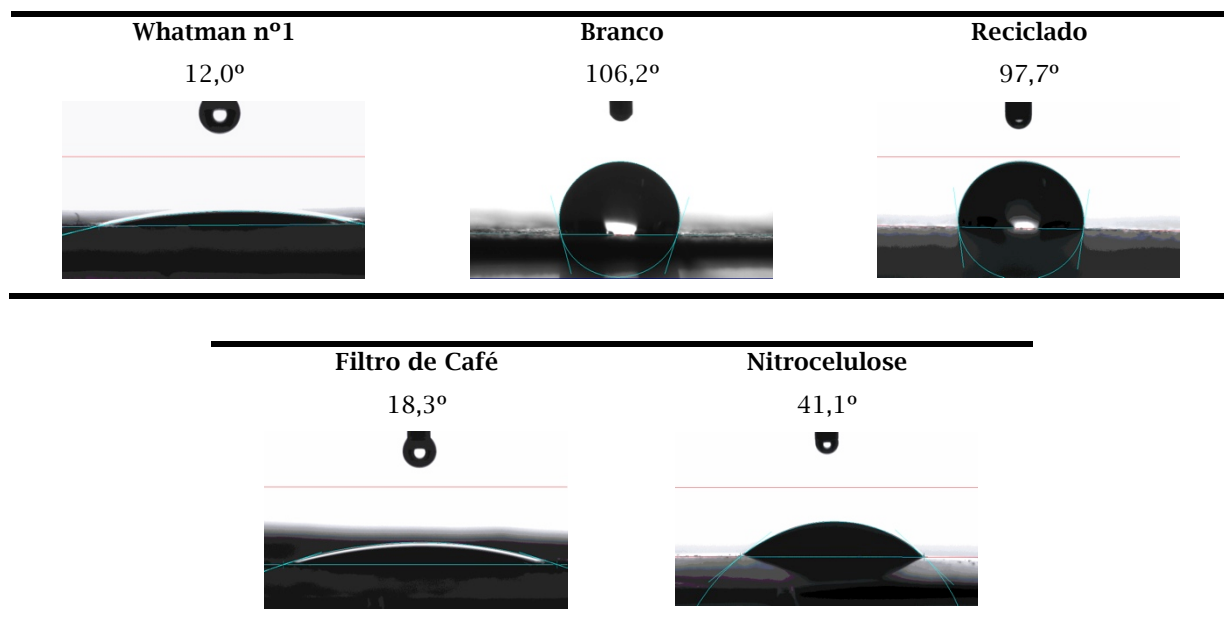


Figura 4.9: Ângulo de contacto dos substratos em estudo.

4.1.5 Análise térmica

A análise térmica do substrato foi conduzida com o intuito de conhecer o seu comportamento quando exposto a temperaturas elevadas. O processo de fabrico dos dispositivos propostos engloba uma fase de aquecimento com temperaturas superiores a 80 °C. O conhecimento das propriedades térmicas, especialmente da temperatura de decomposição do substrato utilizado, é assim um factor importante na sua escolha.

Com base nas técnicas de caracterização analisadas anteriormente e na análise preliminar do método de impressão a cera, foi selecionado o substrato de celulose Whatman nº1 como o substrato que apresenta propriedades mais vantajosas para o desenvolvimento dos dispositivos de microfluídica em papel. As razões que levaram à sua seleção encontram-se explicadas na secção 4.3. A partir daqui foi apenas estudado o substrato escolhido e, quando relevante, comparado com a membrana de nitrocelulose. Na Figura 4.10 encontram-se representados os termogramas obtidos do papel de cromatografia Whatman nº1 e membrana de nitrocelulose.

Verificou-se, observando o termograma do papel Whatman nº1 da Figura 4.10, que o substrato apresenta duas perdas de massa no intervalo caracterizado. A primeira constatou-se para uma temperatura $T = 92,0$ °C, à qual corresponde um pico endotérmico no DSC, e traduz a evaporação de água. A perda de massa resultante desta transformação foi de 2,97%. A segunda perda de massa, associada a três picos endotérmicos no DSC, traduz a degradação da celulose, constituinte principal deste substrato, como verificado pelas técnicas DRX, SEM-EDS, FTIR e FRX. Esta transformação dá-se no intervalo de temperaturas 320-370°C [84] e corresponde a uma perda de massa de 71,16%. No

termograma da nitrocelulose apenas foi identificada uma alteração de massa na amostra, verificada à temperatura de $T = 193,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ e que corresponde à decomposição do material, traduzindo-se numa perda de massa de 83,37%. A esta transformação está associado um pico exotérmico no DSC com uma entropia de 615 J/g.

Quanto mais elevada for a temperatura de decomposição do material, maior é a sua estabilidade térmica e consequentemente maior o índice de cristalinidade. Deste modo é possível afirmar que o papel Whatman é termicamente mais estável que a membrana de nitrocelulose, substrato usualmente utilizado na fabricação de ensaios de fluxo lateral. Como se verificou pela análise DRX o papel Whatman é também mais cristalino que a nitrocelulose.

Concluiu-se que a temperatura de degradação da celulose, que se encontra dentro do intervalo 320-370 $^{\circ}\text{C}$, está muito distante das temperaturas atingidas pelos substratos durante a fabricação dos dispositivos, e das temperaturas a que eventualmente estes poderão encontrar-se expostos, mesmo em condições extremas.

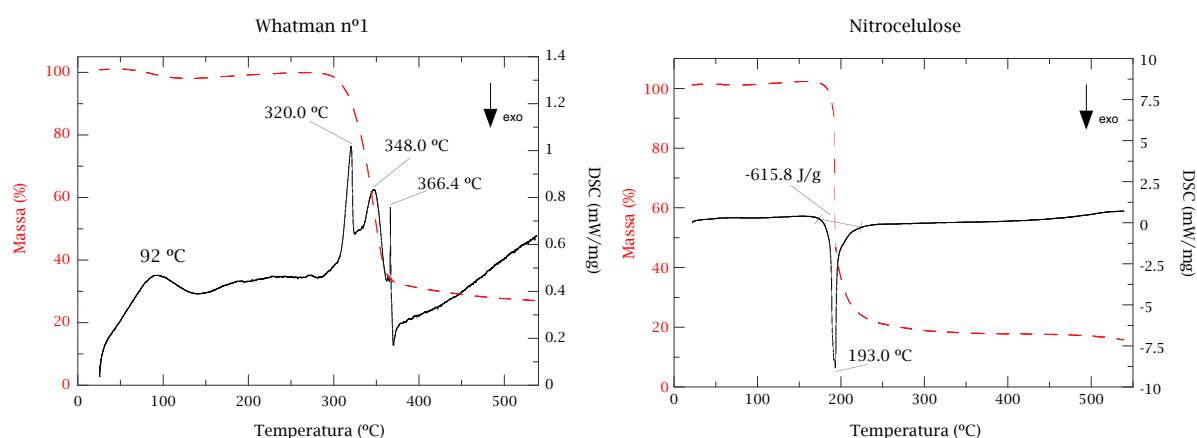


Figura 4.10: Análise termogravimétrica e calorimetria diferencial de varrimento dos substratos papel de cromatografia Whatman n°1 (esquerda) e Nitrocelulose (direita).

4.1.6 Espectroscopia do infravermelho por transformada de Fourier

A espectroscopia do infravermelho por Transformada de Fourier é uma ferramenta que permite a rápida obtenção de informação sobre os elementos e ligações químicas que constituem a amostra em estudo. Esta técnica apresenta diversas vantagens sobre outras técnicas de caracterização química que são muitas vezes demoradas e provocam degradação de amostras como os materiais poliméricos. O espectro do papel Whatman n°1, obtido por FTIR através de ATR com cristal de diamante, encontra-se na Figura 4.11.

Observando o espectro de infravermelho é possível distinguir diversas regiões. A primeira, com números de onda compreendidos entre 4000 e 2500 cm^{-1} , está associada ao estiramento das ligações que envolvem o átomo de hidrogénio, como por exemplo C-H, N-H ou O-H. A maioria dos átomos que constituem uma molécula orgânica têm pesos da mesma ordem de grandeza. O peso do átomo de hidrogénio é uma ordem de grandeza inferior, por isso domina a frequência de estiramento da ligação. A região seguinte do espectro situa-se entre os 2500 e os 2000 cm^{-1} e refere-se às ligações covalentes triplas. Esta região e as duas seguintes apresentam-se por ordem de força da ligação. Assim, após as ligações triplas, encontram-se as ligações duplas, para números de onda entre 1900 e 1500 cm^{-1} .

Finalmente a região das ligações covalentes simples (números de onda inferiores a 1500 cm^{-1}), que é denominada impressão digital, uma vez que é tão característica do composto como a impressão digital é de um determinado indivíduo [70].

O espectro obtido para o papel Whatman nº1 é muito semelhante ao espectro da celulose [87]. Na primeira região foram detectadas duas bandas, de número de onda 3350 e 2900 cm^{-1} , que indicam o estiramento de ligações O-H e C-H, respectivamente.

Na região denominada impressão digital, número de onda inferior a 1500 cm^{-1} , foram detectadas diversas bandas. As bandas de 1425 e 1370 cm^{-1} são características da deformação assimétrica e simétrica dos grupos metileno CH_2 , respectivamente. A banda de 1325 cm^{-1} corresponde à deformação da ligação C-OH da glucose. A banda de absorção a 1160 cm^{-1} é atribuída à deformação assimétrica da ligação C-O-C, enquanto que a banda a 1110 cm^{-1} é típica da vibração simétrica da ligação C-O-C. As bandas de 1060 e 1035 cm^{-1} são relativas à vibração do anel de carbono da glucose, representando o estiramento das ligações C-O e C-H. Por fim a banda a 900 cm^{-1} corresponde à deformação da ligação $\text{C}_1\text{-O-C}_4$ do anel da glucose [84], [87], [88].

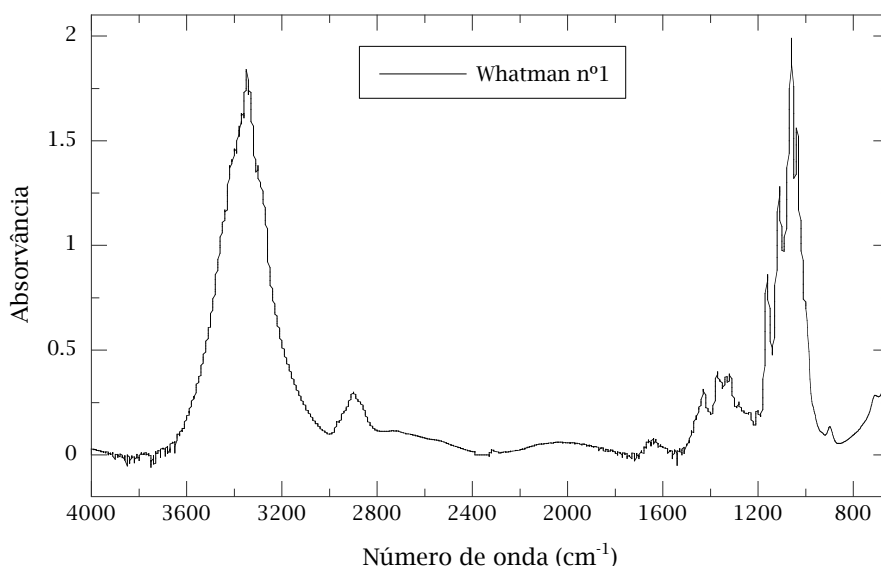


Figura 4.11: Espectro FTIR do papel Whatman nº1.

Todas as bandas descritas acima são características do espectro de infravermelho da celulose, e representam as ligações encontradas na mesma. Pôde-se então concluir que o papel Whatman nº1 é constituído maioritariamente por celulose, não se encontrando indícios de aditivos utilizados na sua produção, como comprovado pelas técnicas DRX e FTIR. Nas técnicas EDS e FRX foi detectada a presença de cálcio, no entanto em quantidades residuais.

O FTIR permitiu ainda concluir que o papel Whatman nº1 não contém resíduos de lenhina, pela ausência de bandas nas regiões entre 1600 e 1500 cm^{-1} [84], [87]. A fonte de fibras utilizada no fabrico do papel de cromatografia Whatman nº1 é o algodão [89]. Deste modo é esperado que a lenhina e a hemicelulose não se encontrem presentes nas suas fibras, visto que estes componentes são específicos da madeira e não se encontram nas plantas de algodão.

4.1.7 Porosimetria

Utilizou-se a intrusão de mercúrio para conhecer a distribuição do diâmetro médio dos poros do papel Whatman nº1. Foi utilizado o porosímetro de mercúrio AutoPore IV da Micromeritics para pressionar o mercúrio a entrar no poros do papel. A Figura 4.12 representa a distribuição do diâmetro dos poros obtida através desta técnica.

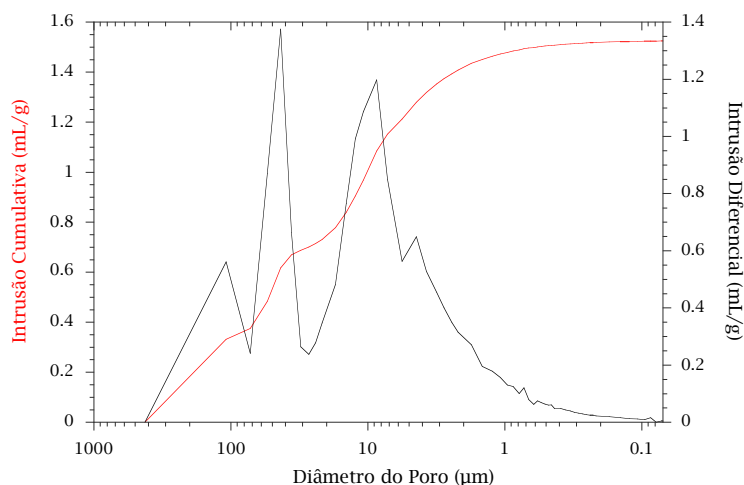


Figura 4.12: Intrusão Cumulativa e Diferencial do mercúrio em função do diâmetro dos poros do papel Whatman nº1.

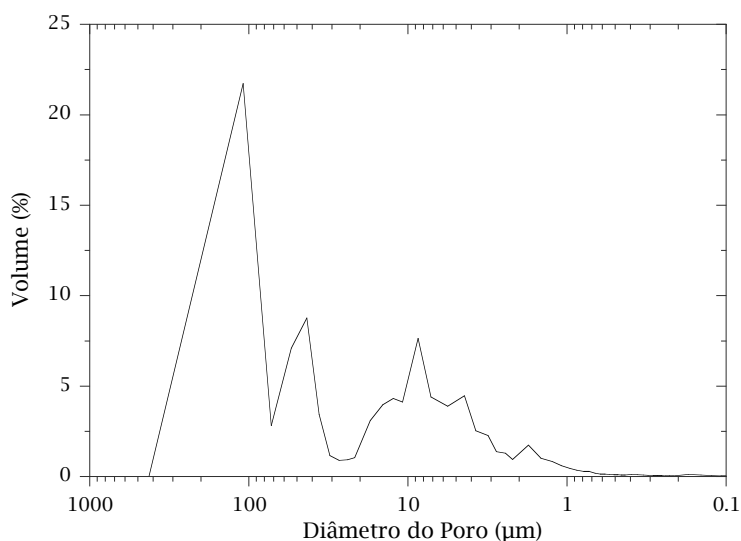


Figura 4.13: Volume em percentagem em função do diâmetro do poro.

Verificou-se através desta técnica que o diâmetro médio dos poros do papel Whatman nº1 é de 100 µm. A distribuição cumulativa demonstrou três degraus na curva, que correspondem a três diâmetros diferentes. O primeiro degrau corresponde aos poros com 100 µm de diâmetro, o segundo a poros com 40 µm e o terceiro a poros com 7 µm de diâmetro. A intrusão cumulativa representa a entrada de mercúrio no poros do papel e os degraus na curva ocorrem quando a pressão do mercúrio é suficiente para penetrar um volume de poros com um determinado diâmetro.

4.2 Caracterização da cera de impressão

A cera de impressão é utilizada neste trabalho para delimitar os canais hidrófilos no papel por onde se deslocam as soluções a ser testadas. Apesar de não ter um papel ativo no funcionamento do dispositivo, contacta diretamente com as soluções e reagentes utilizados nos sensores, constituindo a barreira hidrófoba que limita a ação da capilaridade sobre estes fluídos. Por este motivo a caracterização da cera de impressão é muito importante. A análise da sua composição, estrutura e propriedades pode elucidar sobre eventuais interferências no funcionamento dos sensores, bem como influenciar a otimização do *layout* dos sensores.

4.2.1 Microscopia electrónica de varrimento

Utilizando o microscópio electrónico de varrimento (SEM) estudou-se a morfologia da cera de impressão (Figura 4.14). A amostra representada nas imagens foi recolhida do tinteiro, antes de passar pelo processo de impressão.

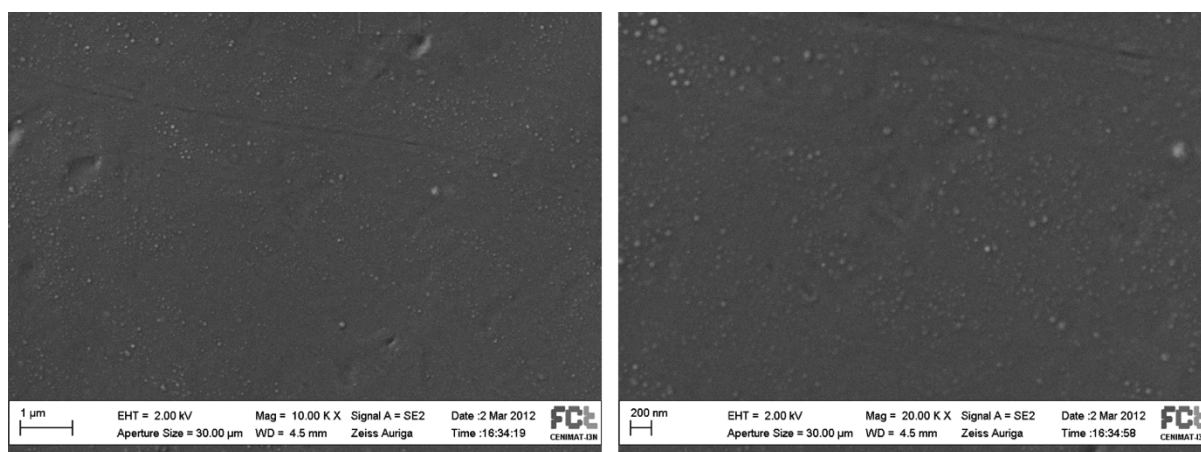


Figura 4.14: Imagens de SEM da cera de impressão com ampliação 10 000x (esquerda) e ampliação 20 000x (direita).

Observando as imagens da Figura 4.14 concluiu-se que a cera de impressão é uniforme, uma vez que a topografia da amostra é um dos principais factores de contraste das imagens obtidas por SEM, e as imagens obtidas são colorimetricamente uniformes. A cera apresenta apenas algumas gotículas e imperfeições causadas durante o processo de solidificação.

O espectro EDS obtido para a cera de impressão encontra-se representado na Figura 4.15.

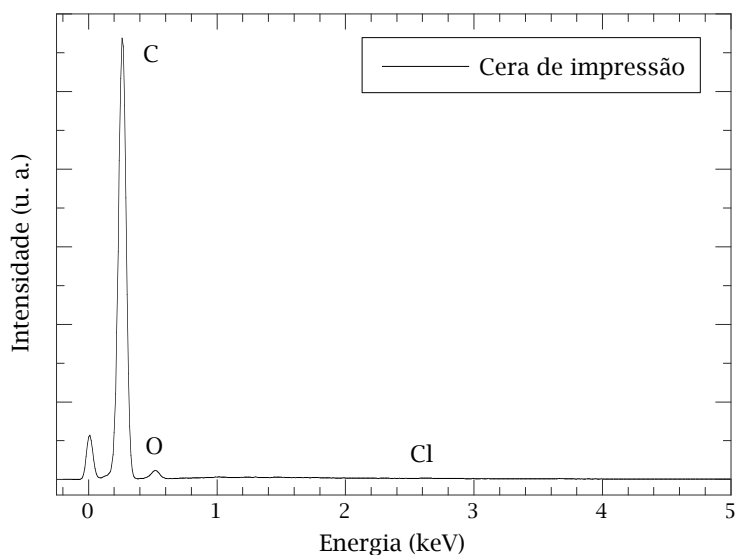


Figura 4.15: Espectro EDS da cera de impressão.

O espectro EDS permitiu identificar na composição da cera os elementos carbono, oxigênio e vestígios de cloro. Como a cera de parafina é um hidrocarboneto estes são os resultados esperados. O cloro, em quantidades residuais, pode fazer parte da composição química dos corantes utilizados na coloração da cera de impressão, uma vez que a cera de parafina é incolor.

4.2.2 Fluorescência de raios-X

Utilizou-se a fluorescência de raios-X para identificar elementos presentes na cera de impressão. Novamente, como a técnica está limitada à identificação de elementos com número atômico superior ao flúor ($Z(\text{F}) = 9$), e como o material em estudo é maioritariamente constituído por átomos de carbono, demonstrado na análise elementar EDS, esta técnica tem como principal propósito a identificação de elementos dos compostos adicionais. Os resultados obtidos encontram-se ilustrados na Tabela 4.4.

Tabela 4.4: Concentração relativa dos elementos detetados na cera de impressão.

Elemento	Concentração (%)
S	0,23
Cl	13,00
Cr	20,00
Cu	18,00
Zn	8,60
Br	40,00
Total	99,83

Foram identificados os elementos enxofre, cloro, crômio, cobre, zinco e bromo na constituição da cera de impressão.

4.2.3 Difração de raios-X

A técnica difração de raios-X foi aplicada à cera de impressão com o objetivo específico de comparar o espectro obtido com o de cera de parafina, que se suspeitava ser o principal constituinte da cera de impressão. Esta técnica permite identificar compostos através do espectro de difração característico de cada estrutura cristalina. Os espectros obtidos para ambas as ceras consideradas encontram-se discriminados na Figura 4.16.

A observação dos espectros obtidos permitiu verificar que os picos de difração característicos da cera de parafina encontram-se presentes na cera de impressão. Os difratogramas são muito semelhantes, pelo que concluiu-se que a cera de impressão é feita à base de parafina. Os picos adicionais encontrados na cera de impressão podem descrever componentes adicionais da sua constituição, como estabilizadores e corantes.

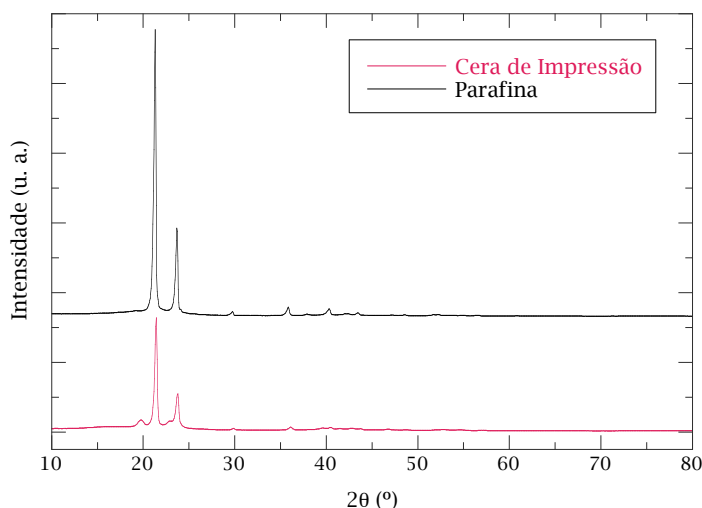


Figura 4.16: Difratograma da cera de impressão em comparação com o de cera de parafina.

4.2.4 Análise térmica

A análise térmica da cera foi importante pois permitiu conhecer as propriedades térmicas do material, especialmente a temperatura de fusão. Este dado é de extrema relevância na otimização da produção das barreiras hidrofóbicas, uma vez que este processo envolve a difusão da cera por toda a espessura do substrato.

O DSC da cera de impressão, ilustrado na Figura 4.17, apresenta um pico endotérmico que corresponde a mudança de estado sólido para líquido. Concluiu-se assim que a temperatura de fusão da cera é de aproximadamente 80 °C. Verificou-se, pelo gráfico correspondente à análise termogravimétrica, que a massa de cera não sofreu alterações significativas durante a realização do ensaio, o que permitiu concluir que a cera não se decompõe quando exposta a temperaturas até 400

°C. Este é um resultado importante pois assegura que não se corre risco de degradação do material em condições extremas.

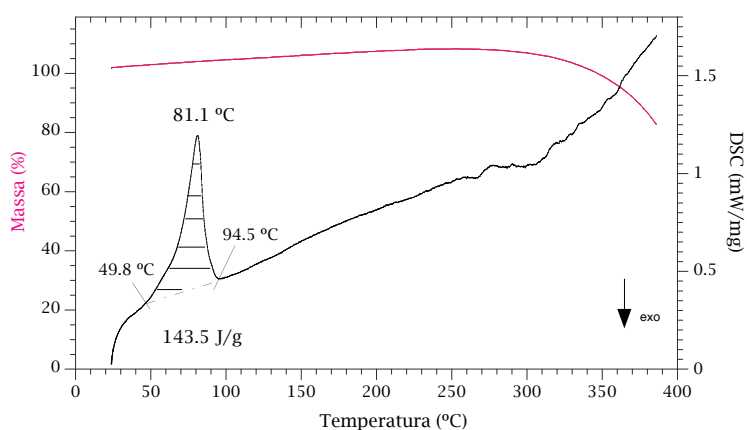


Figura 4.17: Análise termogravimétrica e calorimetria diferencial de varrimento da cera de impressão.

4.3 Escolha do substrato

A escolha do substrato foi influenciada pela análise efectuada durante a caracterização dos substratos em estudo. A caracterização dos substratos permitiu conhecer as suas propriedades e características e relacioná-las com as características que são necessárias ao funcionamento dos biossensores de microfluídica.

O papel de cromatografia Whatman nº1 foi o substrato escolhido para a realização dos biossensores em estudo. Diversas razões influenciaram a escolha deste substrato. Em primeiro lugar este papel não apresenta aditivos na sua constituição, como demonstrado pelas técnicas de caracterização descritas. É constituído maioritariamente por fibras de celulose. As propriedades hidrófilas deste substrato foram outro dos factores que influenciaram na sua escolha. Os biossensores em estudo baseiam-se no deslocamento de fluidos por canais predefinidos. A hidrofília é portanto uma característica necessária para o funcionamento dos sensores.

O papel reciclado foi excluído por ser hidrofóbico e conter muitos aditivos na sua constituição. O papel branco, apesar de ter propriedades ópticas superiores a todos os outros substratos, permitindo o melhor contraste em biossensores cujo sistema de detecção é colorimétrico, apresenta fraca capacidade de absorção e condução de soluções através dos seus capilares.

O papel de filtro de café revelou ser uma boa alternativa ao papel Whatman. No entanto, devido à sua elevada porosidade e baixa densidade demonstrou não ser o ideal para o método utilizado para criar as barreiras hidrofóbicas de cera de impressão. As barreiras criadas neste substrato resultavam muito irregulares, reduzindo a precisão e definição dos canais.

Para além das evidências apresentadas, o papel de cromatografia Whatman nº1 foi utilizado por variados grupos de investigação científica no desenvolvimento de projetos com características semelhantes ao aqui descrito [36], [38], [45], [46], [90], [91].

A membrana de celulose foi incorporada neste estudo uma vez que é um dos material atualmente utilizados em dispositivos de fluxo lateral. Um dos objetivos principais do trabalho é a utilização de microfluídica em papel, em particular a aplicações que envolvem fluxo lateral de soluções, pelo que se

considerou importante a comparação direta entre as propriedades morfológicas, químicas, estruturais e térmicas de ambos os materiais.

4.4 Técnica de impressão

A tinta sólida ou cera de impressão é ambientalmente responsável. Para além de não ter cartucho, como se pode ver na Figura 4.18, a tinta não gera subprodutos poluentes. É fabricada a partir de um polímero não tóxico à base de parafina, semelhante a um lápis de cera. A tinta é sólida à temperatura ambiente, mas para a impressão é aquecida até passar para o estado líquido, o que permite que seja utilizada por um sistema de jacto de tinta.

Uma vez que a tinta sólida não utiliza solventes não há tempo de secagem. Em vez disso a tinta solidifica, preenchendo as falhas no papel ou suporte de impressão de modo a criar uma nova superfície. Por esta razão a impressão a tinta sólida permite cores extremamente vividas.



Figura 4.18: Tinteiros de tinta sólida.

O processo de impressão a tinta sólida divide-se em três passos. Primeiro o rolo de manutenção aplica rapidamente uma camada microscópica de óleo de silicone ao tambor aquecido, para obter uma libertação de tinta fiável, ao mesmo tempo que limpa o tambor eliminando resíduos de tinta de impressões anteriores. Seguidamente, a cabeça de impressão (uniformemente aquecida a 135 °C) aplica gotas microscópicas de tinta derretida no tambor rotativo. As gotas de tinta quando atingem o tambor passam imediatamente a um estado semi-sólido. Por fim, uma folha de papel pré-aquecida é rapidamente alimentada entre o tambor e um rolo de transfixação, transferindo a tinta para o papel. À medida que a tinta no tambor se transfere para o papel penetra nas fibras, mas sem a proliferação dos jactos de tinta líquida nem a dispersão de *toner* do laser. A tinta arrefece e solidifica imediatamente, formando uma forte aderência permanente ao papel. O tempo total do processo de impressão é de apenas 5 segundos [92], [93].

A imagem da Figura 4.19 representa uma visão esquemática do interior de uma impressora de tinta sólida.

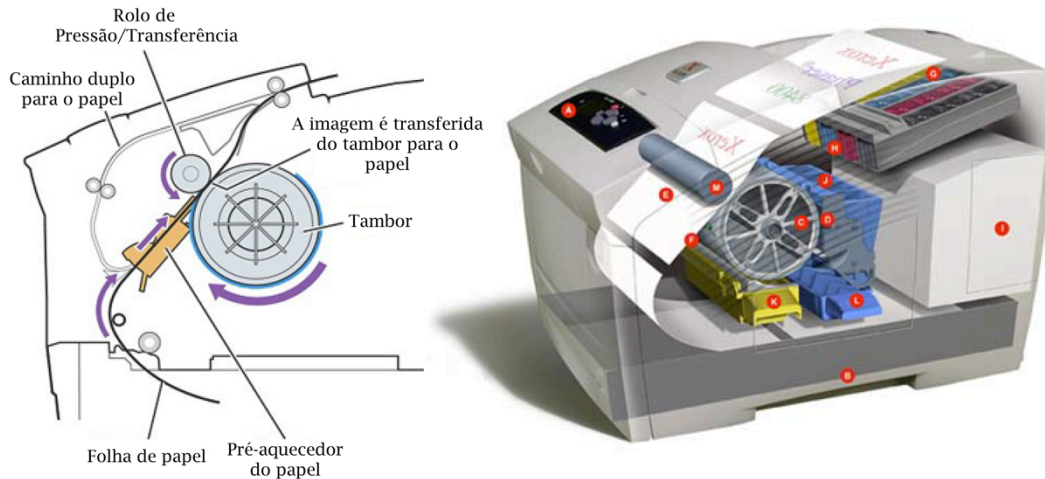


Figura 4.19: Visão esquemática do interior de uma impressora de tinta sólida. A tinta semi-sólida é transferida do tambor para a folha de papel pré-aquecida. O caminho duplo permite a impressão da frente e verso (adaptado de [92]).

Para estudar o processo de impressão foram analisadas linhas de tamanhos nominais entre 100 e 700 μm , com incrementos de 100 μm . As linhas foram impressas e medidas através de fotografias obtidas por microscopia óptica, que se encontram ilustradas na Figura 4.20.

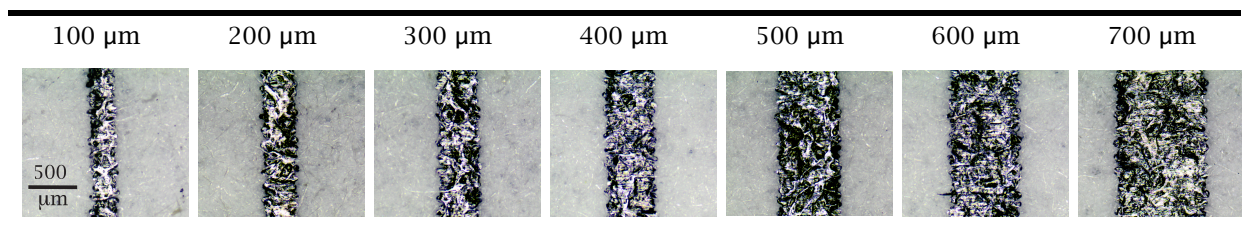


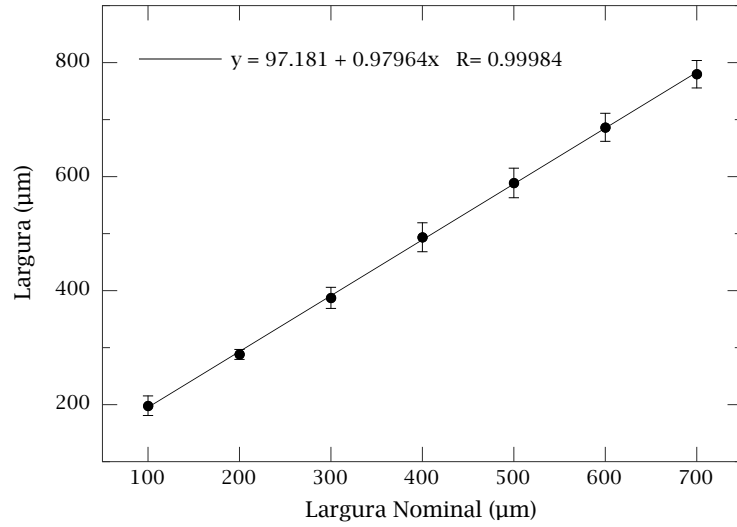
Figura 4.20: Imagens obtidas por microscopia óptica de linhas impressas com larguras nominais entre 100 e 700 μm (incrementos de 100 μm).

Na Tabela 4.5 estão discriminados os valores médios obtidos para cada dimensão nominal. Verificou-se que, para o substrato Whatman nº1, a impressora apresenta uma discrepância de cerca de 90 μm entre o valor nominal e as linhas impressas.

A discrepância encontrada na impressão das linhas é constante e linear para todos os tamanhos de linha, como se verificou através do declive da regressão linear. Concluiu-se então que não se deve a uma falta de resolução da impressora. Pensa-se que a discrepância na dimensão das linhas impressas deverá estar relacionada com a morfologia do papel. O papel Whatman é muito poroso e, como não tem tratamentos, tem uma superfície irregular, o que pode implicar que, aquando da transferência da cera para o substrato, se verifique alguma difusão lateral nos poucos instantes antes de a cera solidificar.

Tabela 4.5: Largura da linha impressa em função da largura nominal. Tabela e representação gráfica.

Largura nominal (μm)	Largura (μm)
100	$198,19 \pm 17,16$
200	$288,36 \pm 8,75$
300	$387,44 \pm 18,32$
400	$493,88 \pm 25,41$
500	$588,98 \pm 25,79$
600	$686,45 \pm 24,49$
700	$779,95 \pm 23,89$



4.5 Estudo da difusão da cera de impressão no substrato

Após a escolha do substrato e o estudo do modo de impressão, é importante definir e caracterizar o método que vai permitir controlar e direcionar o fluxo das soluções aquosas no substrato. Como referido anteriormente, os padrões são impressos na superfície do substrato e posteriormente difundidos, através de uma fonte de calor, por toda a sua espessura. Na Figura 4.21 encontra-se ilustrado o efeito do processo de aquecimento nos padrões de cera impressos.

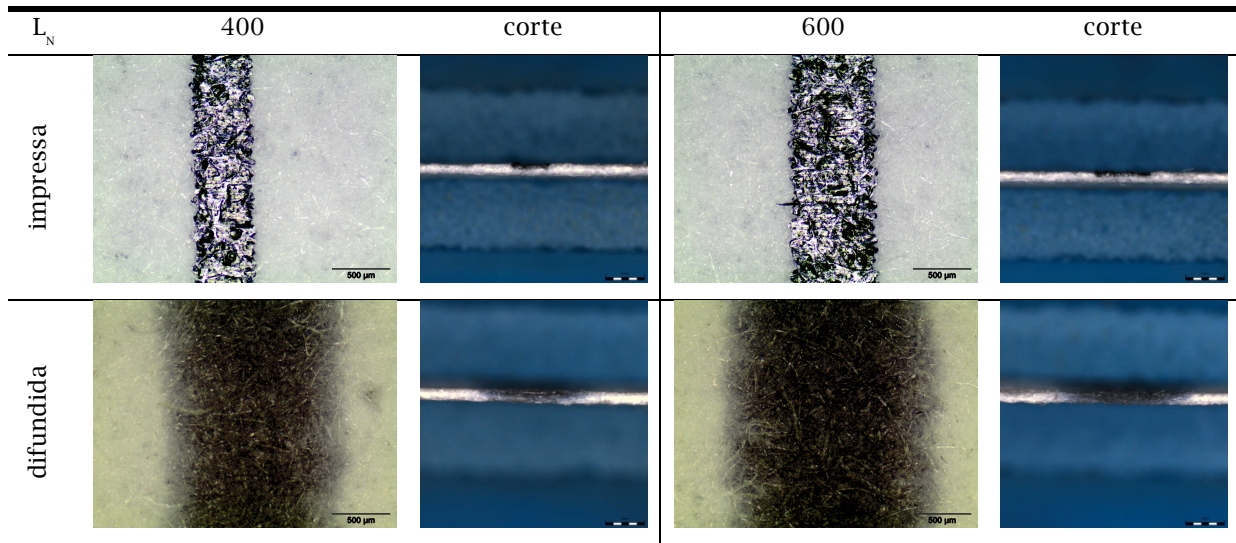


Figura 4.21: Imagens ilustrativas da difusão da cera no papel.

Observando a Figura 4.21 verifica-se que a dispersão da cera durante o processo de aquecimento está de acordo com o modelo previsto. A cera é impressa na superfície do papel e, apesar de sofrer alguma difusão lateral e vertical, não é suficiente para criar barreiras hidrófobas. Após o processo de aquecimento verifica-se a difusão da cera por toda a espessura do papel, difusão vertical, bem como um aumento da largura em relação ao padrão impresso, devido à difusão lateral.

O gráfico apresentado da Figura 4.22 demonstra a relação entre a largura nominal dos padrões e a largura após o processo de impressão e após o processo de aquecimento na frente e verso do papel. Cada largura nominal está representada pela média de cinco linhas independentes e as barras de erro representam o desvio entre elas.

Verificou-se novamente que a difusão da cera por toda a espessura do papel segue o modelo proposto. Para todos os tamanhos nominais verificou-se que a barreira mais larga é a da frente do papel, onde foram impressos os padrões, e que o verso apresenta uma largura inferior, como era esperado. Este é o modelo de difusão que foi encontrado para todas as condições estudadas. Alterações do tempo e /ou temperatura do processo de aquecimento provocam variações na largura final das barreiras mas verificou-se sempre que a barreira da frente é mais larga que a do verso e que ambas são maiores que o padrão impresso na superfície (quando existem).

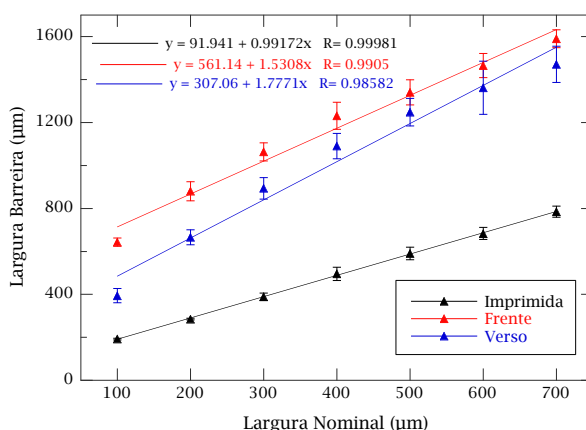


Figura 4.22: Largura dos padrões após impressão e das barreiras (frente e verso do papel) após difusão a 140°C durante 2 minutos, em função da largura nominal dos padrões.

Como foi referido anteriormente, o fluxo de fluídos no papel é descrito pela equação de Washburn [14], uma vez que os poros do papel assumem as propriedades dos capilares. A viscosidade da cera é função da temperatura, pelo que uma fonte de aquecimento uniforme e controlável é necessária para a obtenção de resultados reproduzíveis. Assumindo que o papel é mantido a uma temperatura constante durante o processo de aquecimento, todos os parâmetros da equação de Washburn são constantes, logo a distância que a cera percorre desde a periferia da linha (difusão lateral), será independente da largura nominal, desde que a quantidade de cera não seja limitante [25]. Na Figura 4.23 encontra-se um gráfico da difusão lateral em função da largura nominal, para um processo de aquecimento a 140 °C com a duração de dois minutos (dimensão $n = 5$).

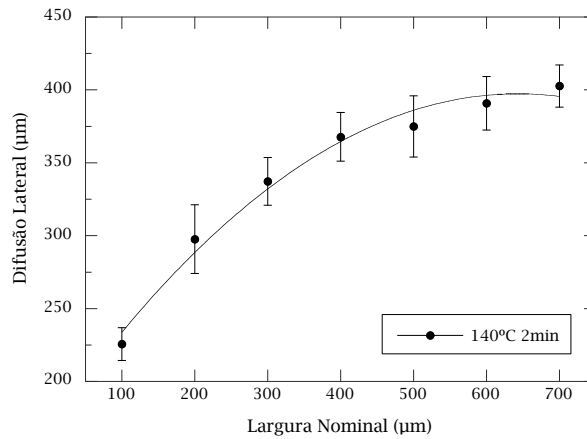


Figura 4.23: Difusão lateral para um processo de difusão a 140 °C durante 2 minutos. Os resultados foram ajustados a uma equação polinomial de segundo grau de equação $d = 168,05 + 0,71324L_N - 0,00055463L_N$ com $R^2 = 0,99156$.

Verificou-se que a difusão lateral não é independente do tamanho nominal da linha e que apresenta um crescimento linear até ao valor nominal 400 µm. Após este valor observa-se uma estabilização dos resultados, dando a entender que para valores mais elevados a quantidade de cera deixa de ser limitativa no processo de difusão.

Acontece que, como a massa de cera é reduzida, as forças de coesão do líquido, em função da sua viscosidade, rapidamente se equilibram com a ação capilar, impedindo o deslocamento do fluido. Como a esta escala as forças inerciais podem ser desprezadas, a força resultante que atua no líquido depende da relação entre as forças viscosas e as forças externas. Considerando a ação capilar como a força externa aplicada sobre a cera, a difusão vai ocorrer até ao ponto em que as forças viscosas e de coesão do líquido sejam superiores e impeçam a progressão da cera. É esperado que quanto menor for a viscosidade, menor será a resistência à ação capilar e portanto maior será a difusão da cera [12].

Estas conclusões foram retiradas através da análise gráfica da difusão lateral para várias temperaturas e tempos de difusão. De um modo geral verificou-se que a quantidade de cera impressa na superfície do papel para valores nominais inferiores a $L_N = 400$ µm não pode ser considerada como uma fonte ilimitada de fluido, que é uma das considerações necessária à aplicação da equação de Washburn [14]. Por outro lado, observando a Tabela 4.5, verifica-se que o declive da reta que descreve o comportamento das linhas impressas em função da largura nominal é aproximadamente 1. Deste modo, para que a difusão lateral fosse constante e independente do tamanho nominal, também o declive das retas após o processo de difusão teria de ser 1. Isto não se verificou. O declive obtido nas regressões lineares que descrevem a tendência da largura das barreiras foi sempre superior a 1. Este facto demonstra que barreiras correspondentes a larguras nominais maiores sofrem uma dispersão lateral superior à experimentada por linhas de tamanhos menores, novamente comprovando a limitação relativa à quantidade de cera.

Na Figura 4.24 estão ilustradas imagens obtidas por microscopia electrónica de varrimento da cera impressa na superfície do papel. A imagem foi capturada na fronteira do padrão de modo a evidenciar o contraste entre a superfície impressa e o papel. Como demonstrado, a impressão a cera é contínua ao contrário da impressão a tinta líquida, cujos padrões são conseguidos através de uma série de pontos individuais, criando uma película sobre a superfície do papel. Este efeito é extremamente importante pois permite que a impressão a cera seja o método utilizado para encapsular o dispositivo. O encapsulamento deve proteger e isolar o canal hidrófilo do exterior, por forma a evitar

contaminações ou interferências não desejadas com o fluxo das soluções. Como a camada de cera impressa assume um comportamento contínuo, este método revela-se promissor.

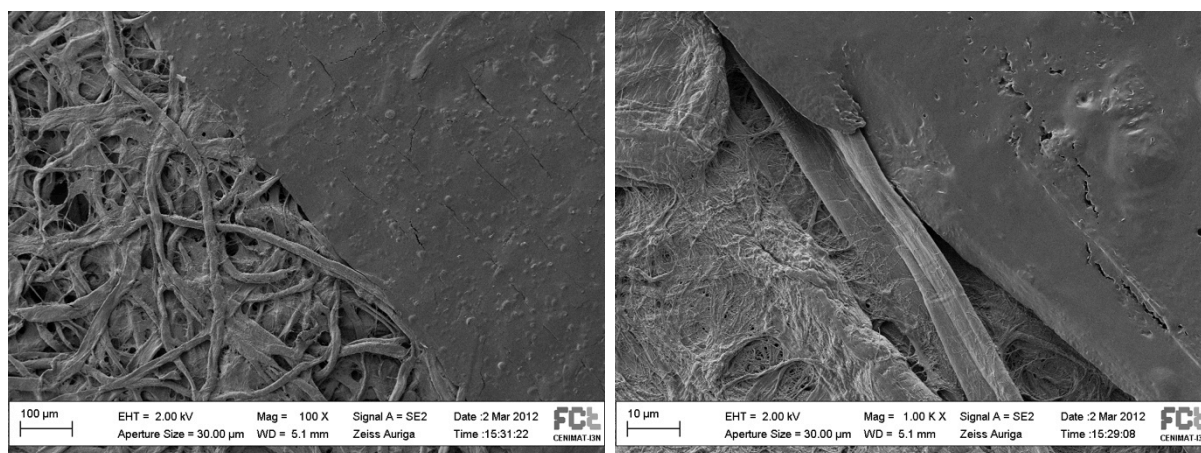


Figura 4.24: Imagens obtidas por SEM da cera impressa na superfície do papel Whatman n°1.

Na Figura 4.25 estão ilustradas imagens obtidas por microscopia electrónica de varrimento da cera difundida por toda a espessura do papel. Demonstrou-se com as imagens captadas que a cera se difunde uniformemente pelo papel, uma vez que não foram detetados blocos ou camadas de cera acumulados em zonas específicas. Este facto é importante pois permite inferir que toda a massa de cera impressa no papel é uniformemente sujeita às condições de difusão.

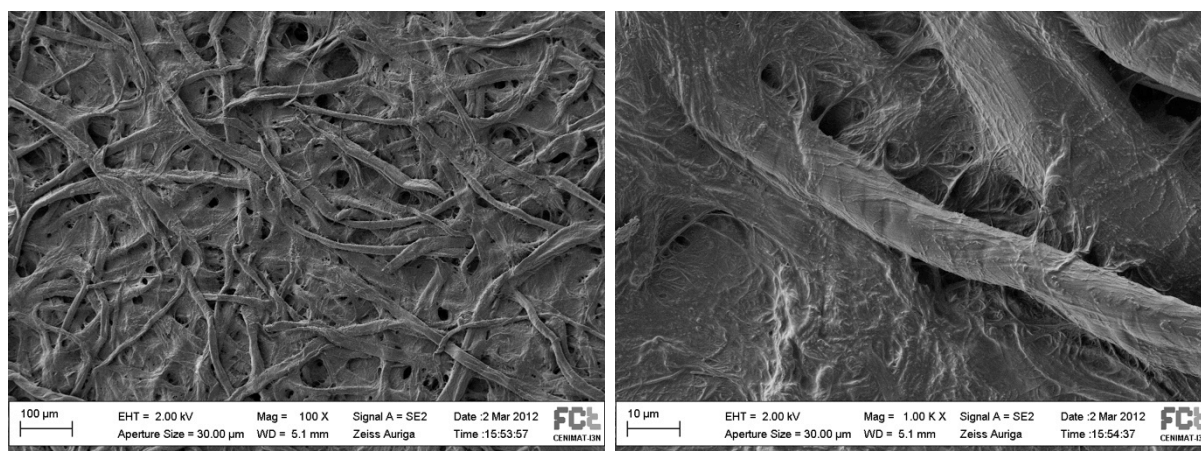


Figura 4.25: Imagens obtidas por SEM da cera depois de difundida por toda a espessura do papel Whatman n°1.

4.5.1 Influência da orientação da impressão e do substrato

Para melhor definir e caraterizar a difusão da cera, é importante estudar a influência que a orientação da impressão e do substrato têm nas dimensões dos padrões criados por este método.

A Figura 4.26 representa uma impressão em folha de acetato de uma linha vertical (A) e horizontal (B). Observando a figura, verificou-se que a orientação da impressão tem influência nos padrões impressos. Linhas impressas verticalmente, ou seja, a favor da rotação do tambor de transferência da impressora, apresentam arestas lisas e bem definidas. Pelo contrário, linhas impressas horizontalmente

apresentam rugosidades ao longo de toda a sua periferia, como se pode ver na Figura 4.26 (B), uma vez que são desenhadas contra a direção das cabeças de impressão.

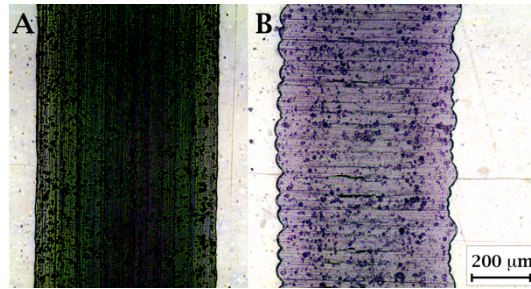


Figura 4.26: Diferença entre a impressão de uma linha vertical (A) e horizontal (B).

A orientação do substrato foi outro fator cuja influência nos padrões se considerou importante definir. Muitos tipos de papel apresentam anisotropia, não apenas tridimensional mas também bidimensional. A anisotropia tridimensional advém do processo de filtração utilizado no fabrico do papel, e verifica-se pela tendência das fibras numa orientação horizontal. A anisotropia bidimensional está relacionada com a direção dos rolos que são utilizados na produção das folhas de papel. Novamente verifica-se que as fibras celulose tendem a orientar-se paralelamente à direção do movimento [1].

Para a realização deste estudo foram analisadas barreiras com larguras nominais entre $L_N = 200$ e $L_N = 1000 \mu m$. Inicialmente analisou-se a influência das orientações definidas na largura das linhas após impressão. O gráfico da Figura 4.27 demonstra os resultados obtidos para as diferentes combinações possíveis entre as duas orientações em estudo. Cada ponto do gráfico representa a média de cinco linhas independentes e as barras de erro representam o desvio entre elas.

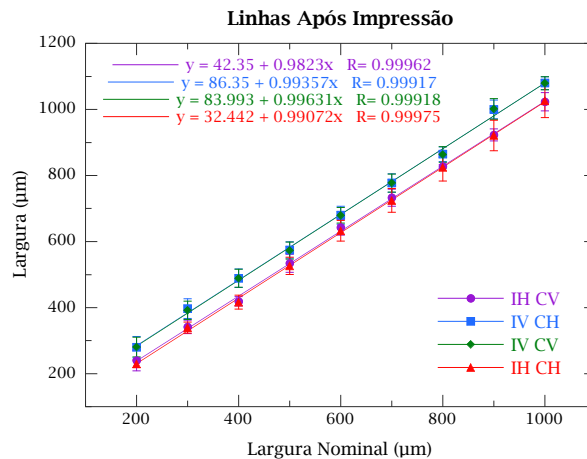


Figura 4.27: Demonstração gráfica dos resultados obtidos para linhas impressas segundo as seguintes combinações: Impressão Horizontal Corte Vertical (IH CV), Impressão Vertical Corte Horizontal (IV CH), Impressão Vertical Corte Vertical (IV CV) e Impressão Horizontal Corte Horizontal (IH CH).

Verificou-se, observando a Figura 4.27, que em relação à impressão das linhas apenas a orientação da impressão tem influência nas dimensões dos padrões resultantes. Deste modo os pontos e regressões lineares das condições IH CV, IH CH e IV CH, IV CV encontram-se sobrepostos. Observou-se que a impressão vertical produz linhas com dimensões cerca de $40 \mu m$ superiores aos gerados pela

impressão horizontal. Este resultado é esperado pois as linhas horizontais apresentam sulcos nas suas fronteiras, fator que influencia a sua largura média.

Seguidamente procedeu-se ao processo de difusão da cera por toda a espessura do papel a temperatura constante (140 °C) durante dois minutos. Nas figuras seguintes encontram-se os resultados obtidos. De modo a isolar o efeito da orientação do papel no processo de difusão, os resultados foram divididos em impressão horizontal e vertical, uma vez que este fator influenciou a dimensão das linhas impressas. Os resultados obtidos para a largura das barreiras na frente do papel encontram-se discriminados na Figura 4.28.

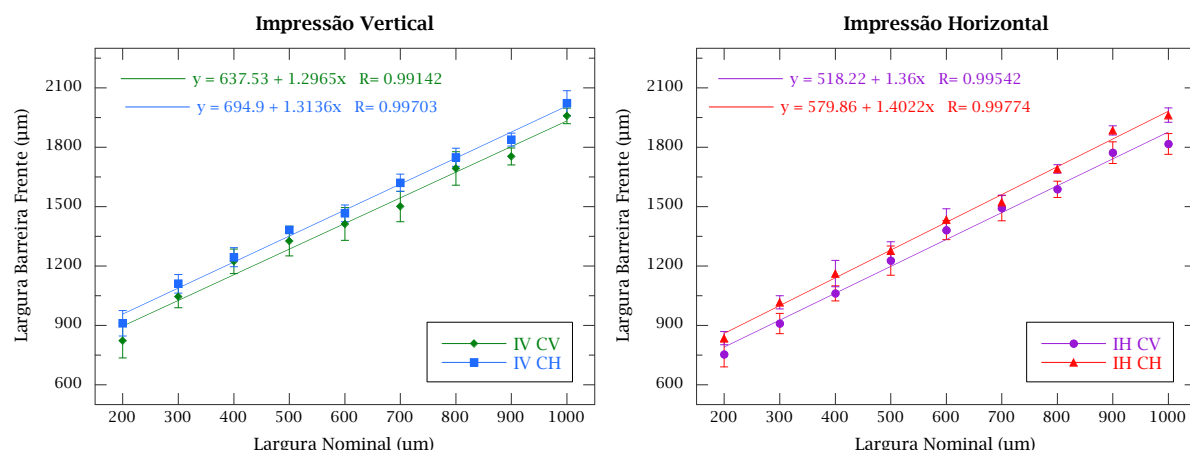


Figura 4.28: Demonstração gráfica da influência da orientação do papel na largura das barreiras na frente do papel para Impressão Vertical e Impressão Horizontal.

Por observação da Figura 4.28, que representa a largura das barreiras na frente do papel, verificou-se que o corte horizontal do papel originou barreiras mais largas para ambas as orientações de impressão. Este não é um resultado esperado, pois esperava-se que cada orientação de impressão potenciase um tipo de corte através do alinhamento entre a orientação das fibras e a direção da difusão lateral. No entanto, como em ambos os casos se verificou uma discrepância de resultados entre os dois cortes do papel, concluiu-se que as fibras do papel têm uma orientação preferencial. Deste modo e face aos resultados obtidos, infere-se que alguma característica da cera ou do processo de impressão esteja na origem da concordância obtida.

O efeito que se esperava obter para as barreiras na frente do papel verificou-se no verso, como se pode observar na Figura 4.29. Assim, para a impressão vertical as barreiras mais largas resultaram do corte horizontal, enquanto que para a impressão horizontal se verificaram no corte vertical. Estes resultados confirmam que existe uma tendência bidimensional na orientação das fibras do papel Whatman nº1.

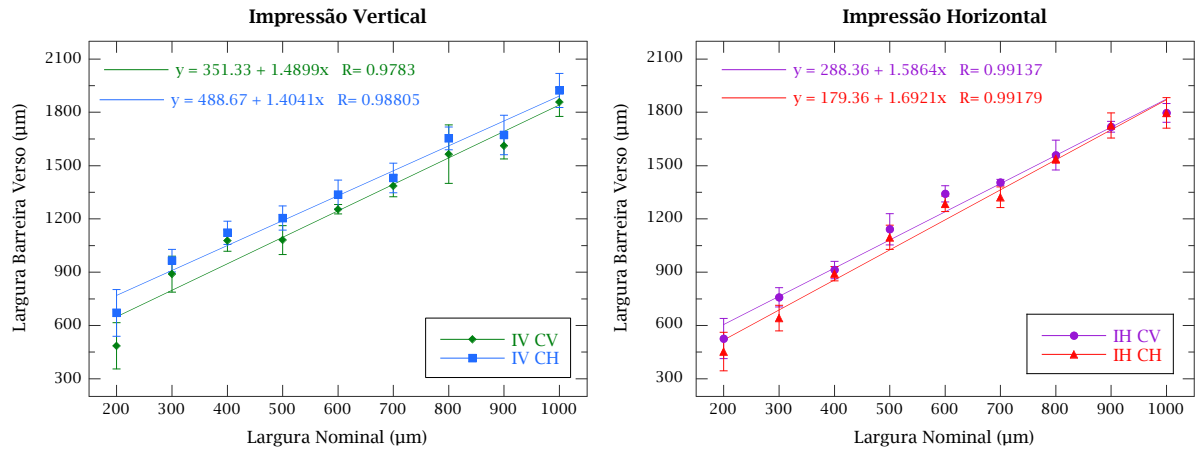


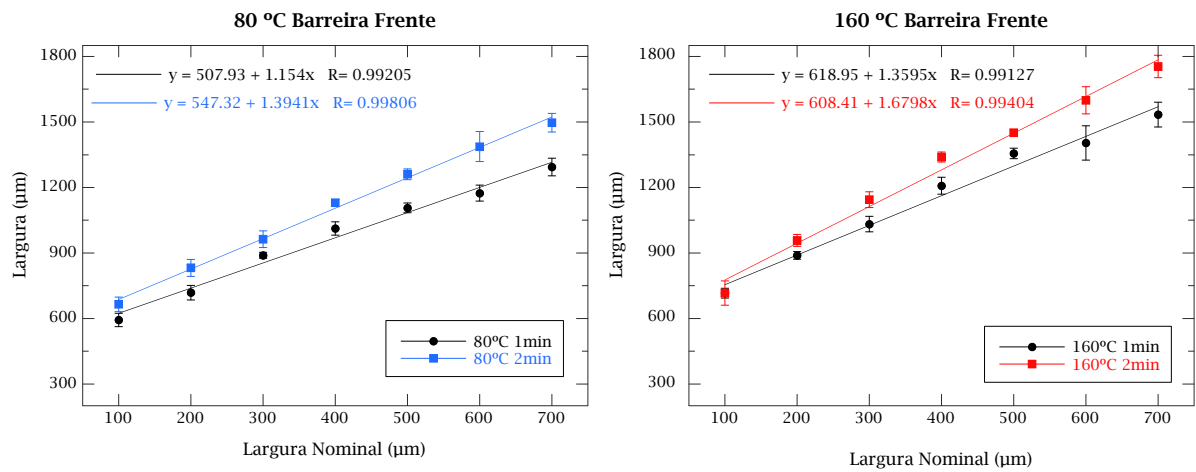
Figura 4.29: Demonstração gráfica da influência da orientação do papel na largura das barreiras no verso do papel para Impressão Vertical e Impressão Horizontal.

Para a produção dos dispositivos de microfluídica em papel optou-se pelo corte do papel com orientação vertical, pois produz barreiras na frente do papel com menor largura, ou seja, menor difusão lateral, para a mesma massa de cera. A difusão lateral da cera é um efeito não desejado do processo de aquecimento, cujo objetivo é criar barreiras hidrófobas através da difusão vertical da cera por toda a espessura do papel. O corte vertical permite também a criação de barreiras no verso de papel com largura maior que o corte horizontal, para uma impressão horizontal. Presume-se que a largura da barreira no verso esteja correlacionada com a eficiência da barreira na delimitação do fluxo de soluções. Deste modo, e como a barreira no verso é sempre menor que na frente do papel, pretende-se que a largura da barreira na frente seja o menor possível e que no verso seja o maior possível. Para a impressão vertical a largura no verso é menor quando o corte é vertical, no entanto esta barreira é maior do que a obtida para a impressão horizontal, o que reforça a preferência pelo uso desta orientação de corte.

4.5.2 Influência do tempo e da temperatura

A duração e a temperatura do processo de aquecimento são dois fatores que influenciam a difusão da cera pela espessura do papel. Para caracterizar e prever o comportamento do método é necessário analisar cada uma destas variáveis.

Segundo a equação de Washburn [14], a difusão é proporcional ao tempo do processo de difusão quando os outros parâmetros são constantes. Deste modo espera-se que, para uma temperatura constante, quanto maior for o tempo de aquecimento, maior será a largura da barreira final. Os gráficos das Figura 4.31 e Figura 4.31 demonstram o comportamento das barreiras na frente e verso do papel, respetivamente, quando expostas a uma temperatura constante (80 e 160 °C) durante tempos diferentes (1 e 2 minutos). Novamente, os pontos do gráfico representam a média de 5 barreiras independentes e as barras de erro o desvio entre elas.



Verificou-se que, de um modo geral, as barreiras geradas por um processo de aquecimento de dois minutos são maiores que as geradas num minuto. É importante notar que a diferença entre a largura das barreiras de um e dois minutos aumenta com a largura nominal. Este aumento reflete a limitação da quantidade de cera nas barreiras menores. Outra evidência desta limitação é o facto de, a temperaturas baixas e um minuto, não existir barreira inferior no verso do papel para larguras nominais de 100 μm. Apesar de não serem apresentados aqui, verificou-se a mesma tendência dos resultados para todas as temperaturas estudadas.

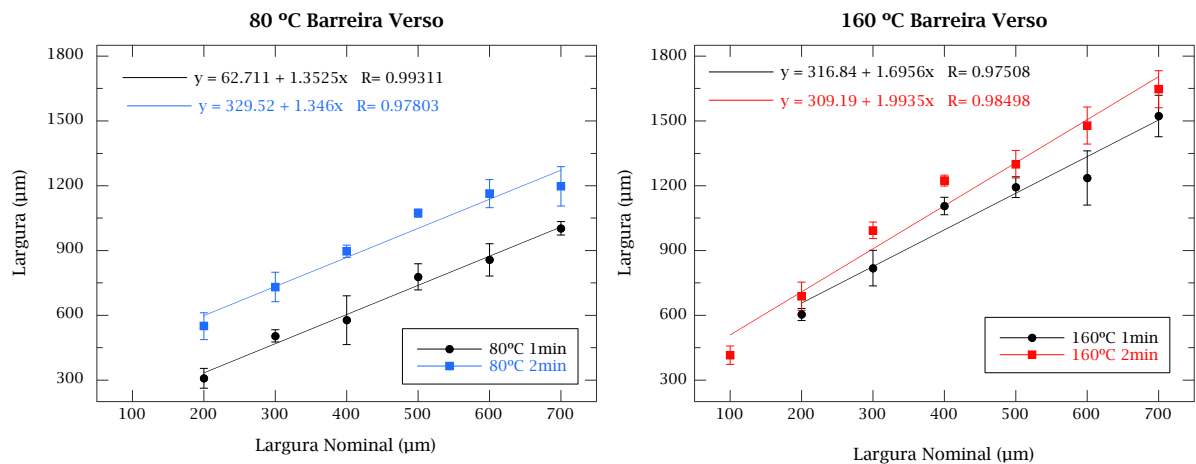
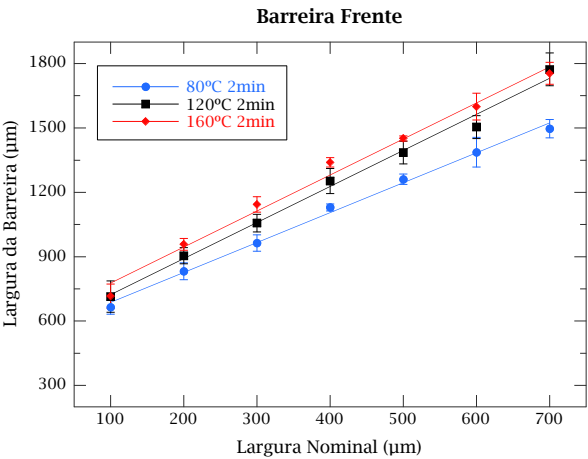


Figura 4.31: Demonstração gráfica da influência da duração do processo de difusão da cera na largura das barreiras para as temperaturas de 80 °C e 160 °C.

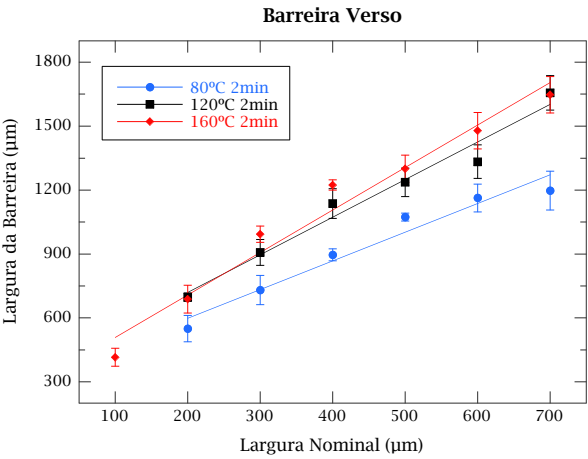
A viscosidade da cera é função da temperatura, pelo que a temperatura é um fator que influencia o processo de difusão da cera no substrato. Para estudar a influência da temperatura no processo de difusão o conjunto de linhas de diferentes tamanhos nominais foi submetido ao processo de aquecimento com as temperaturas 80, 100, 120, 140 e 160 °C. A Figura 4.32 representa os resultados obtidos para a largura da barreira na frente do papel criada pelas diferentes temperaturas e com a duração de dois minutos.



T	Regressão Linear	R ²
80	$L = 547,32 + 1,3941L_N$	0,99806
100	$L = 543,21 + 1,3992L_N$	0,99546
120	$L = 555,03 + 1,6804L_N$	0,99611
140	$L = 561,14 + 1,5308L_N$	0,9905
160	$L = 608,41 + 1,6798L_N$	0,99404

Figura 4.32: Demonstração gráfica da influência da temperatura do processo de difusão da cera na largura das barreiras na frente do papel.

Como era esperado, demonstrou-se que o aumento da temperatura implica um aumento na largura da barreira dos padrões desenhados, tanto na frente como no verso do papel, cujos resultados podem ser observados na Figura 4.33. Apesar de, por uma questão de visualização, não serem apresentadas graficamente as curvas para todas as temperaturas, as respectivas retas de regressão linear são apresentadas na tabela junto aos gráficos. Pode-se, no entanto, afirmar que as temperaturas não apresentadas seguem a tendência demonstrada.



T	Regressão Linear	R ²
80	$L = 329,52 + 1,346L_N$	0,97803
100	$L = 381,05 + 1,3571L_N$	0,98403
120	$L = 367,75 + 1,7635L_N$	0,98522
140	$L = 307,06 + 1,7771L_N$	0,98582
160	$L = 309,19 + 1,9935L_N$	0,98498

Figura 4.33: Demonstração gráfica da influência da temperatura do processo de difusão da cera na largura das barreiras no verso do papel.

Os gráficos da Figura 4.34 representam a influência da temperatura na largura de uma barreira de tamanho nominal $L_N = 400 \mu\text{m}$ e $L_N = 600 \mu\text{m}$.

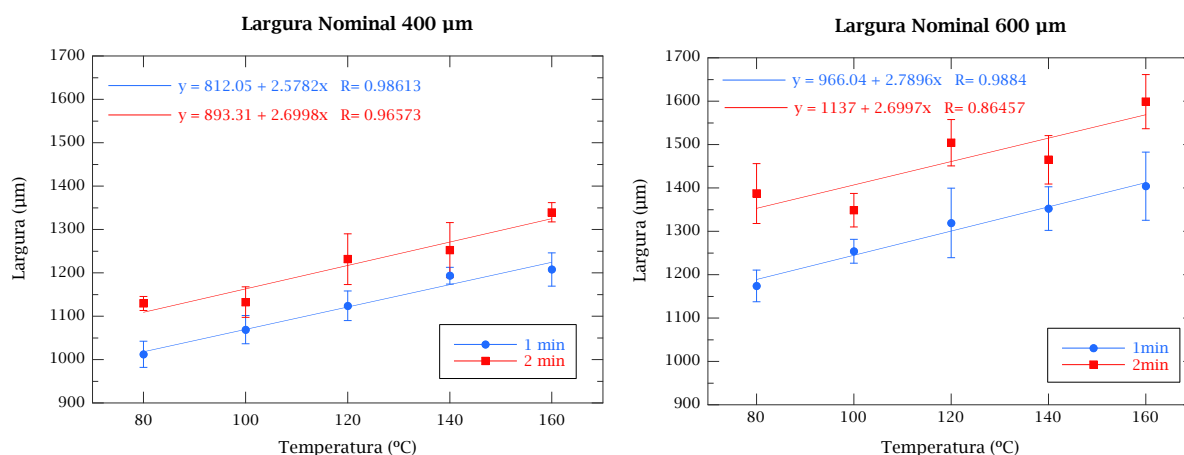


Figura 4.34: Demonstração gráfica da influência da temperatura na largura de barreiras na frente do papel de larguras nominais $L_N = 400 \mu\text{m}$ (esquerda) e $L_N = 600 \mu\text{m}$ (direita).

Verificou-se que, como previsto, a largura de uma barreira de tamanho nominal constante aumenta com o aumento da temperatura. Como referido anteriormente, o objetivo deste estudo é prever as dimensões finais das barreiras, de modo a que possam ser tomadas em consideração na desenho dos padrões. Pretende-se também reduzir o máximo possível a difusão lateral da cera, mas para tal é preciso determinar quais destas barreiras realmente isolam canais hidrófilos, permitindo a condução dos líquidos pelo papel.

4.6 Estudo da resolução do método

O estudo da resolução do método foi efetuado em duas fases. A primeira está relacionada com largura mínima que permite criar uma barreira hidrofóbica. Seguidamente determinou-se qual o canal mínimo, distância entre duas barreiras hidrofóbicas, que permite a passagem dos fluídos por capilaridade.

4.6.1 Largura da barreira hidrofóbica

Após o estudo do processo de difusão da cera por toda a espessura do papel, foi necessário definir quais das barreiras criadas delimitam canais hidrófilos, permitindo controlar e conduzir o fluxo das soluções. O processo de difusão da cera, especificamente a profundidade da difusão (difusão vertical), depende da temperatura e do tempo do recozimento. Para criar uma barreira hidrofóbica é necessário que a difusão vertical da cera abranja toda a espessura do papel e que seja uniforme ao longo do canal. O estudo apresentado consiste na criação de canais com diferentes larguras e orientações e foi conduzido para todas as temperaturas e tempos em estudo. A verificação da eficiência das barreiras foi realizada com o auxílio de uma solução de corante alimentar azul de concentração 1:40 (v/v) em

água destilada. As figuras seguintes representam o rendimento obtido para canais verticais (Figura 4.35), horizontais (Figura 4.36) e para poços (Figura 4.37) que foram submetidos a processos de aquecimento com todas as temperaturas em estudo e com a duração de dois minutos. O mesmo procedimento foi efetuado para processos de difusão com a duração de um minuto. Os resultados obtidos encontram-se no AnexoII.

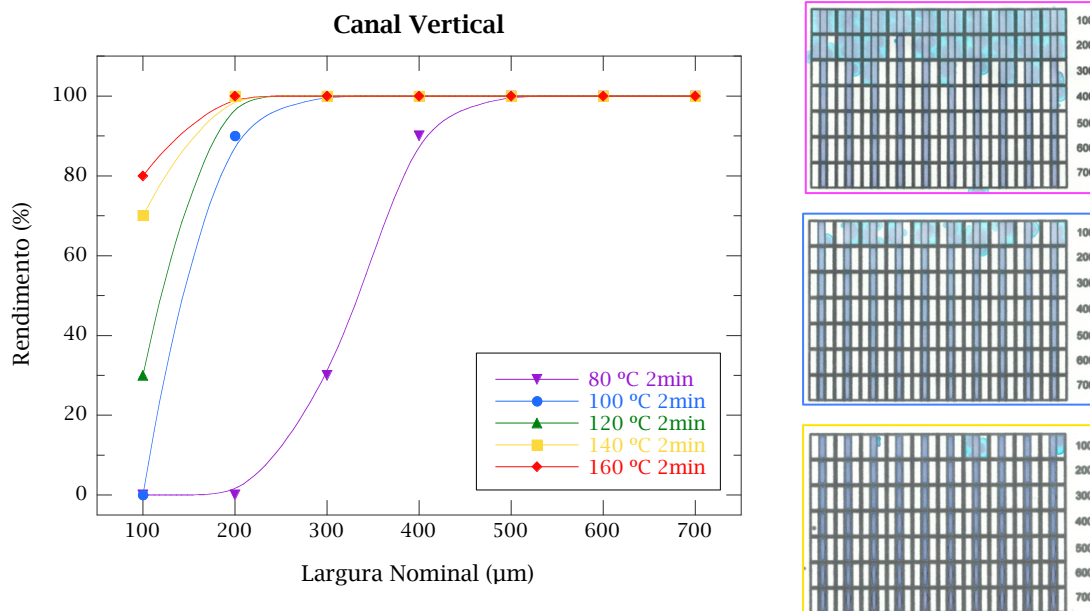


Figura 4.35: Rendimento de barreiras verticais em função da largura nominal para processos de difusão a diferentes temperaturas e duração de dois minutos.

Verificou-se, como esperado, que o rendimento das barreiras aumenta com a temperatura do processo de aquecimento. Para canais verticais, temperaturas superiores a 120 °C permitem uma eficiência de cem por cento na criação de barreiras hidrófobas para tamanhos nominais superiores ou iguais a $L_N = 200 \mu\text{m}$.

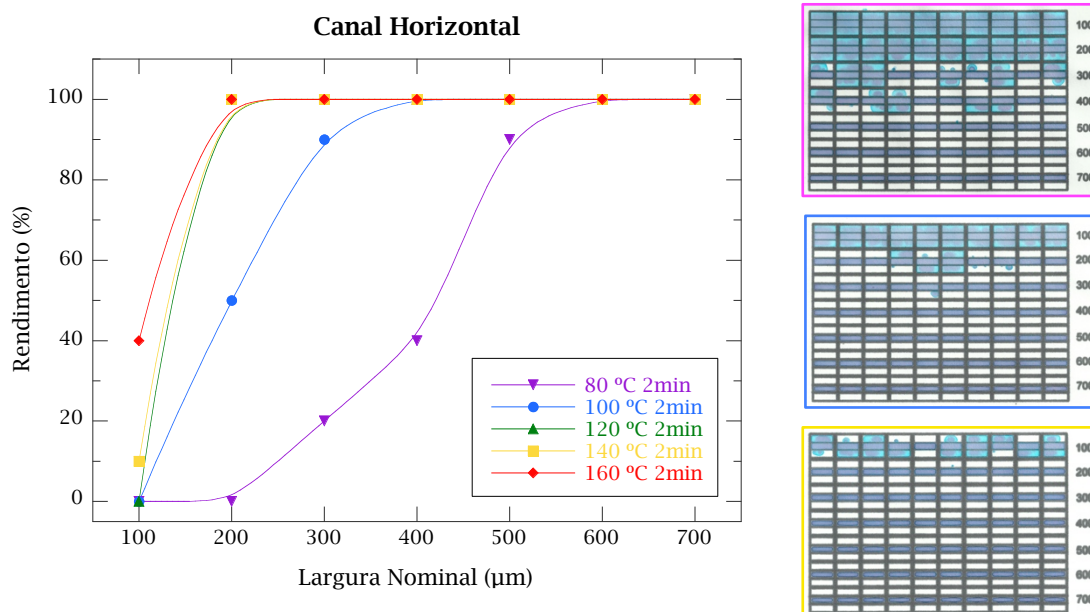


Figura 4.36: Rendimento de barreiras horizontais em função da largura nominal para processos de difusão a diferentes temperaturas e duração de dois minutos.

Concluiu-se ainda que não é possível criar barreiras verticais hidrófobas de largura nominal $L_N = 100 \mu\text{m}$, uma vez que em nenhuma das condições estudadas estas demonstraram um rendimento de cem por cento.

Para os canais horizontais tiraram-se conclusões semelhantes que nos verticais. Verificou-se que com temperaturas superiores a $120 \text{ }^\circ\text{C}$ foi possível criar barreiras hidrófobas de $L_N = 200 \mu\text{m}$ com cem por cento de eficiência e que não foi possível gerar barreiras hidrófobas para $L_N = 100 \mu\text{m}$.

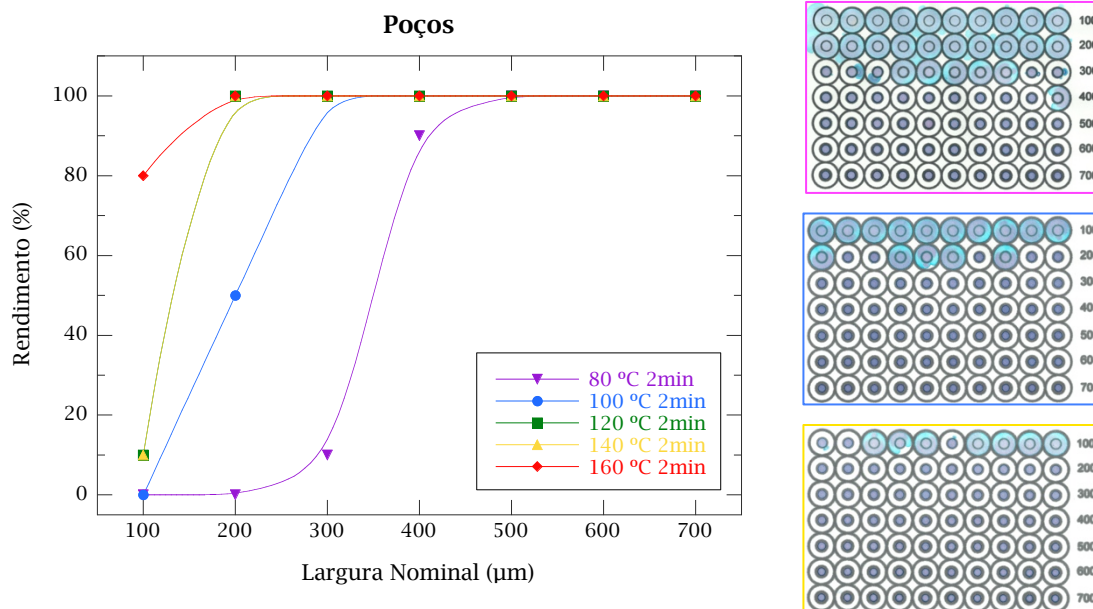


Figura 4.37: Rendimento de poços em função da largura nominal para processos de difusão a diferentes temperaturas e duração de dois minutos.

Nos poços, barreiras circulares que são usadas para delimitar zonas de depósito de amostras e zonas de teste, verificou-se o mesmo comportamento. Este resultado é esperado uma vez que as barreiras circulares são uma combinação das barreiras verticais e horizontais.

De um modo geral observou-se que a eficiência das barreiras verticais é superior à das horizontais. Este resultado está relacionado com a orientação da impressão que, como se concluiu na secção 4.5.1, produz barreiras verticais com larguras no verso superiores às das barreiras horizontais.

O rendimento das barreiras circulares é, como esperado, o intermédio entre as verticais e horizontais.

Face aos resultados obtidos optou-se por utilizar no fabrico dos dispositivos de microfluídica em papel um processo de aquecimento a $T = 120 \text{ }^\circ\text{C}$ com a duração de dois minutos. No entanto, para efeitos de redução de custos, a produção industrial deste tipo de dispositivos pode ser realizada com temperaturas e tempos inferiores, mantendo um rendimento de cem por cento na produção de barreiras hidrófobas.

4.6.2 Largura do canal hidrófilo

A largura do canal hidrófilo é a distância entre as duas barreiras hidrófobas que o delimitam. O canal mínimo foi determinado a partir da menor distância entre duas barreiras que permite a

passagem de fluidos por um percurso com 1,5 centímetros de comprimento. Considerou-se como canal funcional aqueles que apresentaram rendimento de cem por cento quanto à passagem da solução.

O canal mínimo foi determinado para duas larguras nominais distintas, 400 e 600 μm , pois estas são as larguras utilizadas na fabricação dos biossensores apresentados. Foram também testadas as duas orientações de impressão, vertical e horizontal. Os resultados obtidos encontram-se ilustrados na Figura 4.38.

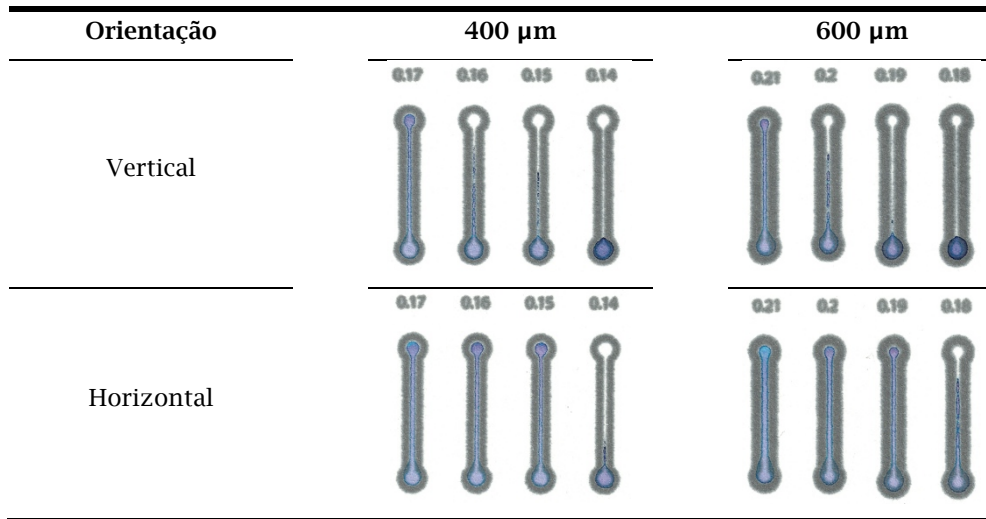


Figura 4.38: Resultados obtidos no estudo da resolução do canal hidrófilo. O valor apresentado sobre os canais traduz a distância entre os centros das barreiras e é apresentado em centímetros.

Verificou-se que a distância mínima entre barreiras (L_0) é maior para a impressão vertical do que para a impressão horizontal em ambos os tamanhos de linha estudados. Este resultado está de acordo com os estudos da secção 4.5.1 que indicam que a impressão vertical é responsável por linhas com largura média superior às criadas a partir de uma impressão horizontal. Constatou-se que a diferença na distância L_0 entre barreiras verticais e horizontais é de 200 μm para ambos os tamanhos nominais de linha em estudo. Observou-se também que as distâncias L_0 obtidas para as barreiras $L_N = 400 \mu\text{m}$ e $L_N = 600 \mu\text{m}$ diferem de 200 μm , o que coincide com a diferença entre os seus valores nominais.

Na Tabela 4.6 encontram-se representados os resultados obtidos para a largura do canal hidrófilo.

Tabela 4.6: Largura do canal hidrófilo.

Largura Nominal	Orientação da Impressão	Distância entre barreiras (μm)	Largura da Barreira (μm)	Largura do Canal (μm)
400 μm	Vertical	1700	$1244,60 \pm 48,40$	$337,90 \pm 48,40$
	Horizontal	1500	$1162,10 \pm 66,66$	$445,40 \pm 66,66$
600 μm	Vertical	2100	$1466,70 \pm 42,80$	$633,30 \pm 42,80$
	Horizontal	1900	$1434,00 \pm 56,28$	$466,00 \pm 56,28$

Concluiu-se que o canal hidrófilo mínimo que pode ser construído pelo método de impressão a cera apresenta um valor médio de 470,65 μm .

4.7 Aplicações desenvolvidas

4.7.1 Dispositivo para medição do pH de soluções aquosas

O dispositivo para medição do pH de soluções aquosas foi implementado como descrito no AnexoIII.1.

Os dispositivos desenvolvidos foram testados utilizando soluções de pH conhecido. Os resultados obtidos encontram-se discriminados na Figura 4.39.

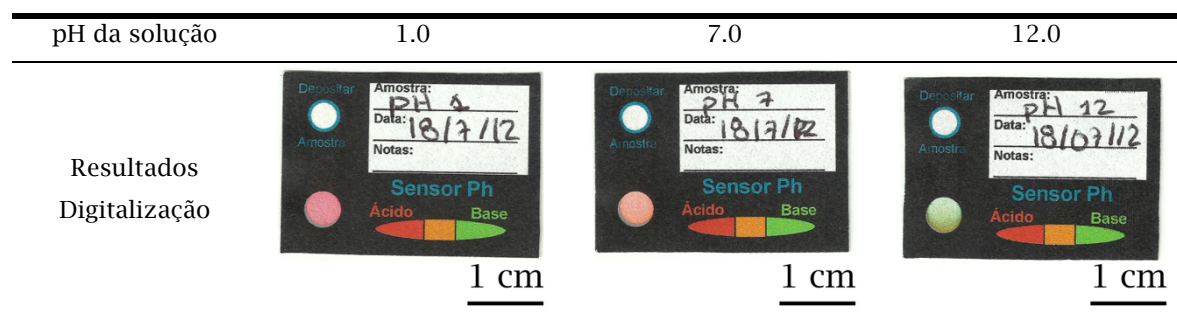


Figura 4.39: Ilustração dos resultados obtidos com o sensor de pH.

Este dispositivo foi implementado como prova de conceito. Permitiu demonstrar que o fluxo de soluções no papel permite a sua interação com reagentes depositados anteriormente em zonas específicas e que o resultado pode ser visualizado através de uma alteração de cor. Verificou-se também que o encapsulamento, apesar de diminuir a altura do canal devido à difusão da cera no processo de impressão, não impede o deslocamento dos fluídos por capilaridade.

Na Tabela 4.7 encontram-se discriminados os custos dos materiais necessários à construção do dispositivo desenvolvido. É de notar que o custo da impressão foi calculado com base no rendimento em área de impressão de cada tinteiro de tinta sólida. Para um sensor encapsulado considera-se três impressões (canal, encapsulamento da frente e verso) com a área total do dispositivo. Especialmente no caso da impressão do canal, esta é uma estimativa por excesso. Os cálculos representam assim, um valor aproximado do custo do sensor.

Tabela 4.7: Custos de produção do sensor de pH.

Material	Quantidade	Custo	Custo/dispositivo
Whatman nº1	35x25 mm ²	5,76 €/m ²	5,04 x10 ⁻³ €
Tinta Sólida	3x 35x25 mm ²	0,28 €/m ²	7,34x10 ⁻⁴ €
Indicador de pH	2 µL	200 €/L	4,0 x10 ⁻⁴ €
Total			6,17 x10 ⁻³ €

4.7.2 Dispositivo para medição do nível de glucose de soluções

A utilização de múltiplos indicadores para determinação da concentração de analitos em soluções aquosas num substrato de papel foi introduzido por Dungchai e colegas em 2010 [33].

A utilização de múltiplos indicadores para a detecção de um único analito visa o aumento da precisão na determinação da sua concentração. Os indicadores apresentam intervalos de detecção distintos, o que permite determinar uma gama de concentrações mais abrangente do que num sensor com um único indicador. Por outro lado, o objetivo principal do projeto é desenvolver dispositivos POC, dispositivos cuja interpretação seja acessível a pessoas não especializadas. Assim, a diversidade de indicadores, para além de aumentar a gama de concentrações detetadas, permite maior discriminação visual facilitando a leitura do resultado.

No AnexoIII.2 demonstram-se as etapas do fabrico do biossensor proposto para a detecção, por múltiplos indicadores, da concentração aproximada de glucose em soluções biológicas.

O volume de solução a utilizar foi definido como o volume mínimo necessário para que a difusão abranja toda a área delimitada pelas barreiras hidrófobas. Para a sua determinação foram analisados os resultados da deposição de diversos volumes de corante alimentar azul no canal criado para este dispositivo. Os resultados podem ser observados na Figura 4.40.

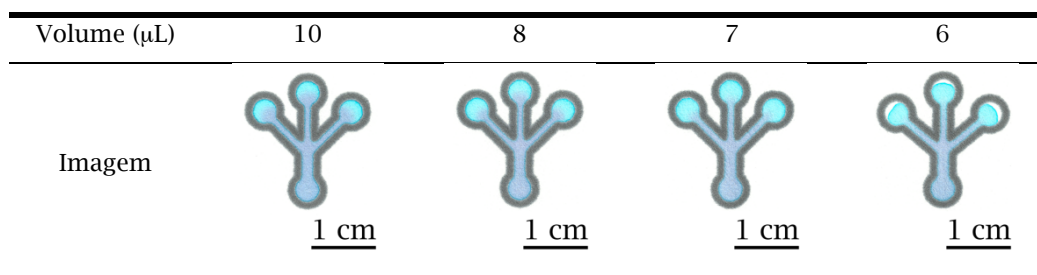


Figura 4.40: Determinação do volume mínimo da solução a testar que pode ser utilizado no sensor de glucose.

O comportamento dos fluídos num meio poroso é controlado por duas forças distintas. A ação capilar exerce pressão sobre o fluído levando-o a deslocar-se. Por outro lado as forças viscosas contrariam a ação da capilaridade promovendo a coesão do líquido.

Verificou-se que a deposição de 6 μL de corante alimentar no canal em estudo não é suficiente para abranger toda a área delimitada pelas barreiras de cera. Deste modo concluiu-se que o volume mínimo de solução que pode ser testado na utilização do biossensor desenvolvido é de 7 μL . Este foi o volume de solução utilizado em todos os ensaios realizados, incluindo os ensaios utilizados para obter a curva de calibração que permitiu determinar a concentração aproximada de glucose em soluções desconhecidas. No entanto, como os dispositivos são fundamentalmente desenvolvidos para utilização em meios sem acesso a equipamento laboratorial, a necessidade de um volume de amostra específico não é praticável. Apesar de não terem sido conduzidos ensaios que analisem a influência do volume de solução nos resultados obtidos, outras publicações que utilizam métodos semelhantes para a detecção de analitos em soluções biológicas relatam que o volume de amostra utilizado tem pouca influência nos resultados [33], [46].

Para analisar o funcionamento do sensor utilizaram-se 15 soluções padrão com diferentes concentrações de glucose. Um volume de 7 μL de cada solução foi depositado na zona de depósito e os resultados foram analisados visualmente e através do software de análise de imagem ImageJ. As

imagens resultantes encontram-se listadas na Figura 4.41, bem como a concentração das diferentes soluções padrão utilizadas.

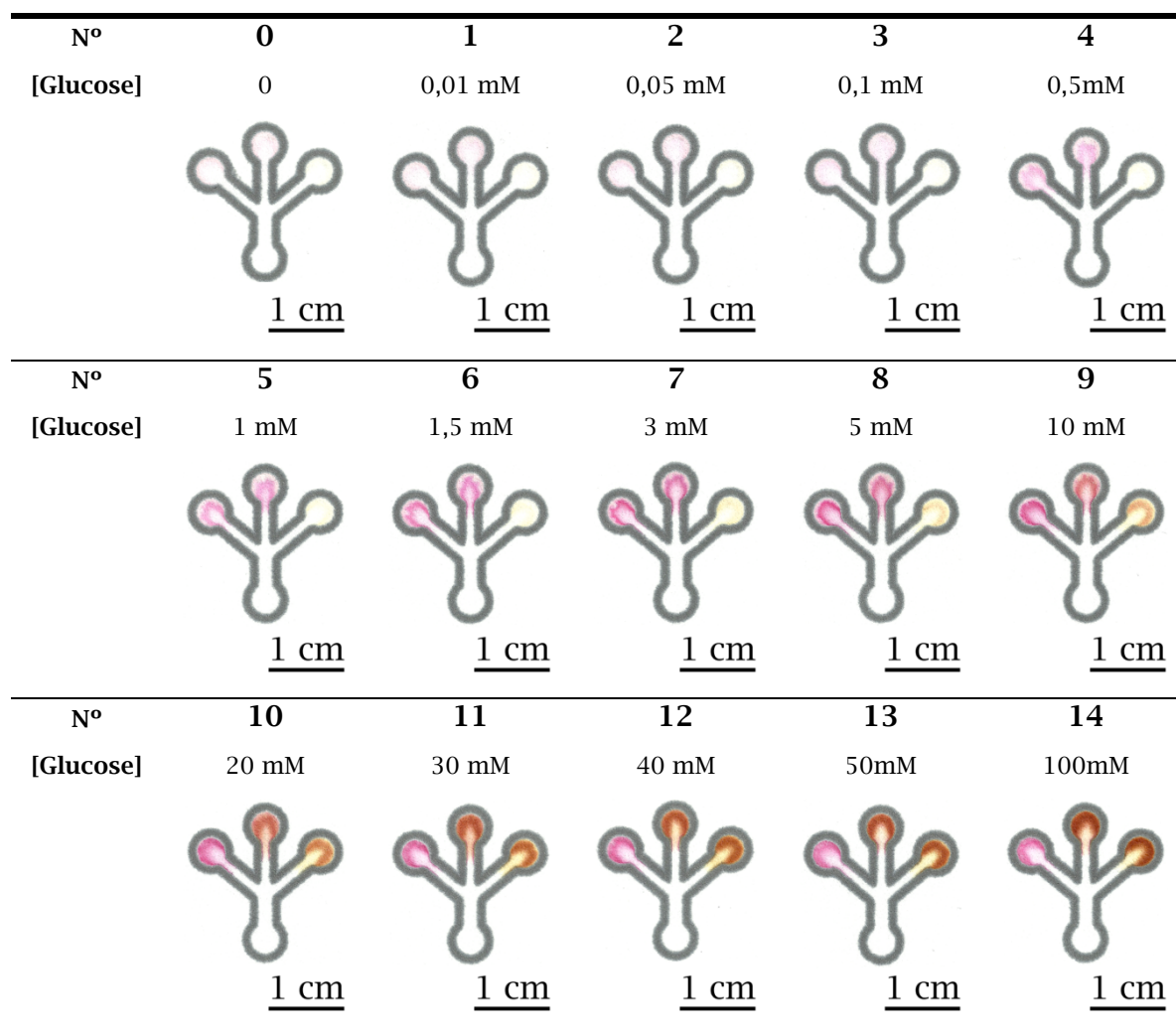


Figura 4.41: Ilustração dos resultados obtidos com o sensor de glucose.

O mecanismo de detecção da glucose baseia-se na oxidação da glucose em ácido glucónico e peróxido de hidrogénio, por ação da enzima glucose oxidase, e subsequente redução do peróxido de hidrogénio e oxidação dos indicadores, reação catalisada pela enzima peroxidase. A oxidação dos indicadores manifesta-se com uma alteração colorimétrica, utilizada para quantificar a concentração de glucose da amostra [33], [46]. O ião iodo (I^-), presente no indicador KI, oxida para iodeto (I_2), passando de transparente para amarelo-acastanhado. O indicador AB quando oxidado produz uma alteração colorimétrica de transparente para magenta.

Observando os dispositivos representados na Figura 4.41, verificou-se que os reagentes depositados dissolvem-se na solução e fluem com a frente da amostra. No entanto é visível uma variação colorimétrica dependente da concentração de glucose.

Foi possível detetar visualmente uma intensificação regular da cor do indicador AB até concentrações de 10 mM. A partir desta concentração de analito verificou-se uma estabilização da intensidade colorimétrica.

O indicador KI não demonstra variações colorimétricas nos primeiros níveis de concentração estudados, mas a partir de 1 mM o aumento da intensidade colorimétrica é visível com o aumento da concentração de glucose, sendo que as soluções de menor concentração apresentam um coloração amarela que se vai intensificando até finalmente as soluções mais concentradas apresentarem coloração acastanhada.

O indicador AB+KI comporta-se como, e é na realidade, uma mistura dos dois indicadores referidos. Até concentrações de 5 mM descreveu o comportamento do indicador AB, revelando um intensificação da cor magenta com o aumento da concentração do analito. A partir de 10 mM e para concentrações mais elevadas, verificou-se a influência do KI, que se revelou numa alteração do magenta para o castanho característico deste indicador.

As imagens da Figura 4.41 foram analisadas com o software de análise de imagem ImageJ. Utilizou-se a média aritmética da intensidade dos píxeis nos três canais RGB compreendidos em cada zona de teste para quantificar a resposta colorimétrica. De modo a eliminar a influência da coloração de fundo, aos valores obtidos foi subtraído o valor de um teste efectuado com solução de concentração de glucose 0 mM. Os resultados encontram-se representados na Figura 4.42. Cada ponto dos gráficos corresponde à média de quatro ensaios distintos. As barras de erro representam o desvio padrão entre os quatros ensaios.

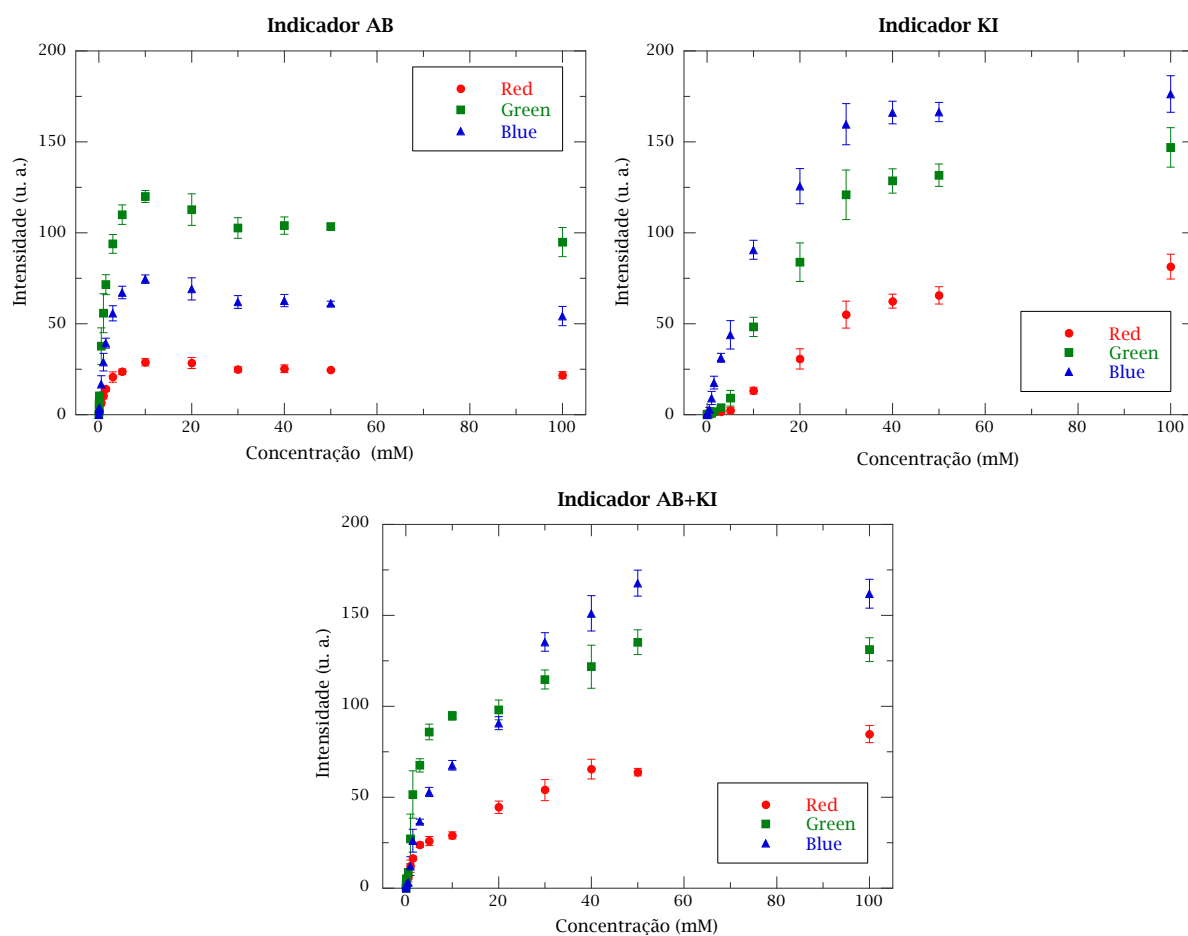


Figura 4.42: Análise RGB dos diferentes indicadores para as diversas concentrações de glucose.

Observando o gráfico da Figura 4.42 obtido através da zona de teste onde apenas foi depositado o indicador AB, verificou-se que os três canais RGB (vermelho, verde e azul) demonstram comportamentos idênticos. Para baixas concentrações de glucose apresentam um rápido crescimento de intensidade colorimétrica e após 10 mM de concentração, a intensidade estabiliza. Concluiu-se, então, que o intervalo de concentrações que este indicador consegue quantificar é inferior a 10 mM. Como os três canais apresentam o mesmo comportamento, basta um para caracterizar o comportamento do indicador em função da concentração de glucose. Selecionou-se o canal verde, pois proporciona uma maior amplitude de intensidade entre as diversas concentrações, permitindo uma determinação mais precisa do nível de glucose. Por razões idênticas foi escolhido o canal azul para descrever o comportamento do indicador KI. Como se pode verificar pela observação do gráfico correspondente, também neste caso os três canais apresentem tendências semelhantes. Neste caso o indicador é sensível para concentrações mais elevadas, permitindo a determinação da concentração até aos 40 mM. Para concentrações inferiores a 1 mM o indicador KI é menos sensível do que o AB, como se pode observar nos gráficos da Figura 4.43. Verificou-se que os limites de detecção inferiores dos indicadores AB e KI são de 0,01 mM e 1 mM de glucose.

Pode-se então concluir que estes indicadores são complementares e que a sua utilização conjunta é essencial para o aumento do espectro de concentrações que o sensor permite quantificar. Com isto em vista, fez-se uma zona de teste com ambos os indicadores.

Observando o gráfico da Figura 4.42 correspondente ao indicador AB+KI verificou-se um fenómeno semelhante aos resultados visuais. Até concentrações de 5 mM o indicador AB lidera o comportamento do indicador, graficamente representado pelo canal verde, canal de maior intensidade do indicador AB. Para concentrações superiores a 10 mM o indicador KI domina e o canal de maior intensidade passa a ser o azul. Quando dissociados, verificou-se que ambos assumem o comportamento demonstrado no poço em que se encontram individualmente.

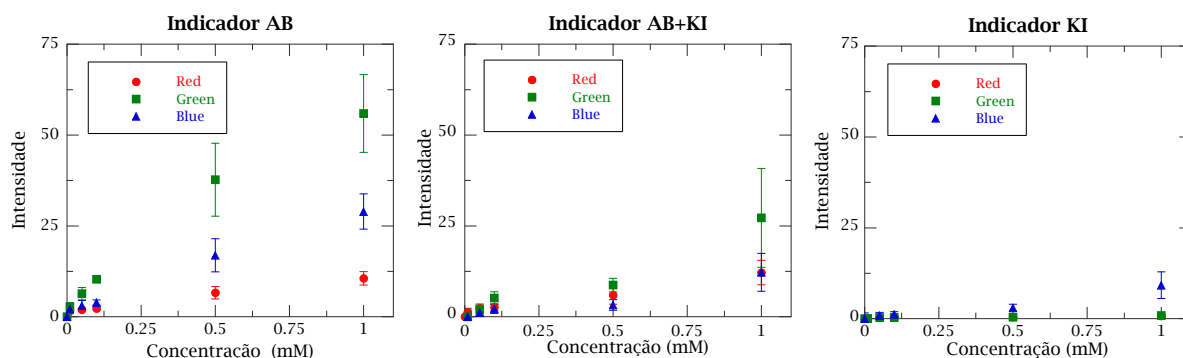


Figura 4.43: Análise RGB dos diferentes indicadores para concentrações de glucose inferiores a 1 mM.

Na Figura 4.44 os resultados encontram-se divididos em dois canais RGB, verde para baixas concentrações, que representa o comportamento do indicador AB, e azul para concentrações elevadas, demonstrando o comportamento do indicador KI. O indicador AB mostrou um comportamento linear para concentrações de glucose entre 0,01 mM e 1,5 mM, que se adapta a uma recta de declive 46,668 e ordenada na origem 6,2006 com um valor de R^2 de 0,98567. De igual modo a mistura de indicadores demonstrou um comportamento linear no canal verde para estas concentrações com declive 44,5, ordenada na origem 3,5885 e R^2 de 0,99643. O comportamento do indicador KI, para concentrações entre 1 mM e 40 mM, foi simulado por uma equação polinomial de segundo grau do tipo $y = m_0 + m_1 x$

+ $m_2 x^2$, com $m_0 = 4,848$, $m_1 = 8,7394$, $m_2 = - 0,1185$ e com um R de 0,99697. Consequentemente o comportamento da mistura de indicadores no canal azul demonstrou um comportamento semelhante com os parâmetros $m_0 = 32,135$, $m_1 = 6,6967$, $m_2 = - 0,08426$ e com R de 0,9969. Estas são as curvas de calibração que permitiram identificar o nível de glucose de uma solução de concentração desconhecida.

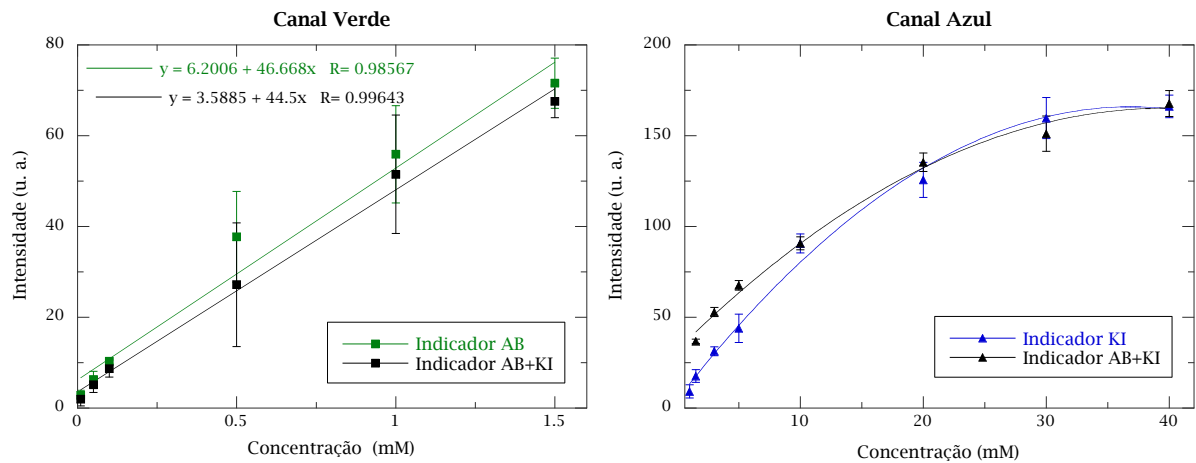


Figura 4.44: Curvas de calibração para os diferentes indicadores. Os resultados foram divididos em dois canais RGB, verde para baixas concentrações e azul para concentrações elevadas.

Apesar de a junção dos indicadores AB e KI não fornecer informação adicional nem aumentar o espectro de concentrações identificadas, visualmente tem extrema importância pois a cor que revela permite à partida identificar se a concentração de glucose é baixa (magenta) ou elevada (castanho). Para além disso, serve também como duplicado do teste, permitindo confirmar os resultados, aumentando a precisão da quantificação do nível de glucose.

Na Figura 4.45 encontram-se representados alguns exemplos do dispositivo final.

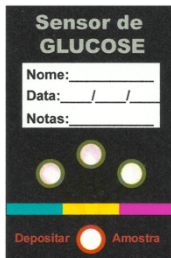
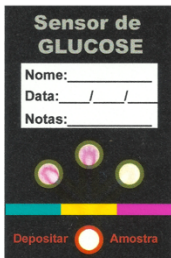
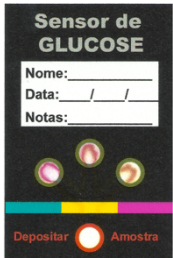
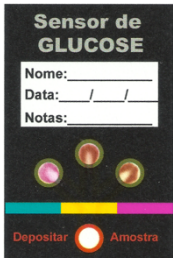
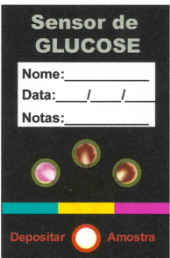
Nº	1	6	8	11	14
[Glucose]	0,01 mM	1,5 mM	5 mM	30 mM	100 mM
					
	<u>1 cm</u>	<u>1 cm</u>	<u>1 cm</u>	<u>1 cm</u>	<u>1 cm</u>
Análise					

Figura 4.45: Ilustração dos resultados obtidos com o sensor de glucose encapsulado.

Os custos apresentados na Tabela 4.8 não incluem as despesas associadas à eletricidade despendida pela impressora na impressão do canal e encapsulamento dos sensores, e pelo prato de aquecimento no processo de difusão que permite a formação das barreiras hidrófobas a partir do canal impresso na superfície do papel. Também não está incluída a água destilada utilizada para fazer

a solução tampão. Por outro lado é necessário notar que os custos são apresentados sobre o valor dos produtos adquiridos em pequenas quantidades e que numa linha de produção poderiam facilmente apresentar custos por unidade bastante inferiores, quer pela aquisição de quantidades industriais como pela promoção de contratos com as empresas fornecedoras.

Tabela 4.8: Custos de produção do sensor de glucose.

Material	Quantidade	Custo	Custo/dispositivo
Whatman nº1	30 x 46 mm ²	5,76 €/m ²	7,95x10 ⁻³ €
Tinta Sólida	3x 30 x 46 mm ²	0,28 €/m ²	1,16 x10 ⁻³ €
Reagentes			
Solução Enzimática	3x 1 µL	5080 €/L	1,52 x10 ⁻² €
Indicador AB	2x 1 µL	14,8 €/L	2,95 x10 ⁻⁵ €
Indicador KI	2x 1 µL	23,0 €/L	4,59 x10 ⁻⁵ €
Total			2,44 x10 ⁻² €

4.7.3 Dispositivo para diagnóstico de tuberculose - *Gold on Paper*

A implementação do dispositivo para diagnóstico da tuberculose demonstra uma abordagem diferente da utilizada nos outros dispositivos. O funcionamento deste biossensor depende do reconhecimento de membros do MTBC (*Mycobacterium tuberculosis Complex Species*) por nanossondas de ouro através da sua hibridação com sequências de ADN específicas das espécies alvo. As nanossondas de ouro apresentam um cor vermelha intensa, resultante da ressonância plasmónica de superfície das nanopartículas de ouro. Após agregação induzida por sal, a presença da sequência complementar do alvo impede que as nanossondas de ouro se agreguem, mantendo a cor vermelha original. Na ausência da sequência de ADN complementar à sequência das nanossondas, estas vão sofrer agregação e a solução revela uma cor azul devido ao desvio da frequência de ressonância plasmónica de superfície.

A hibridação específica das nanossondas com os seus alvos complementares resulta numa cor vermelha intensa, que é facilmente diferenciada da presença de uma sequência não complementar demonstrada por uma coloração azul. Esta variação colorimétrica está relacionada com a agregação das nanossondas de ouro quando na presença de sequências alvos não complementares, que pode ser induzida através da adição de uma solução de cloreto de magnésio. Deste modo o fluxo das soluções através de canais microfluídicos não é necessário, pois não se pretende nem uma fixação de moléculas numa zona específica da matriz de papel, nem a divisão igualitária de uma solução de amostra por um número de zonas de teste. Assim, o suporte do ensaio foi simplificado, utilizando-se uma microplaca de papel para a realização dos ensaios Figura 4.46.

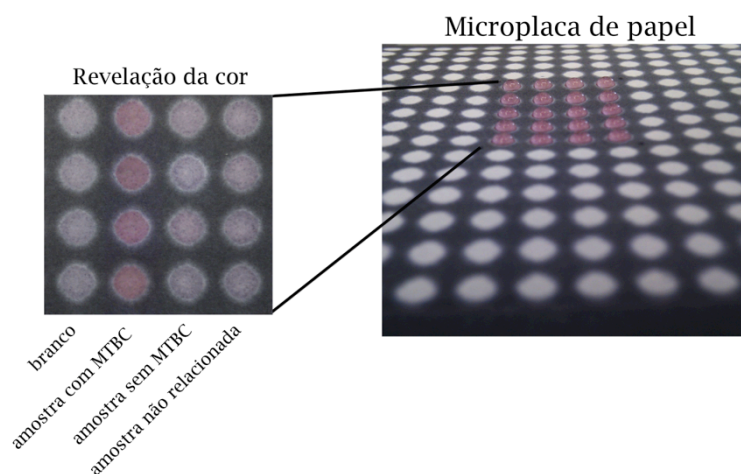


Figura 4.46: Ilustração da utilização do dispositivo de papel para diagnóstico da tuberculose .

A análise dos resultados obtidos baseou-se no rácio entre a contribuição das nanossondas não agregadas (vermelho) e a contribuição das nanossondas agregadas (azul).

Com base no espectro UV/visível, obtido a partir do método convencional com um leitor de microplacas, calculou-se o rácio entre a absorvância a 526 nm, contribuição da fracção de nanossondas não agregadas, e a absorvância a 600 nm, contribuição das nanossondas agregadas. Os resultados obtidos neste ensaio encontram-se discriminados na Figura 4.47 A. As barras representam a média de três medições independentes e as barras de erro indicam o desvio padrão. Verificou-se que um rácio de 1 pode ser considerado como o ponto de equilíbrio entre nanossondas não agregadas e agregadas e, conseqüentemente, como o valor que discrimina, respetivamente, amostras positivas e negativas. Deste modo foi possível identificar as amostras que contêm a sequência alvo.

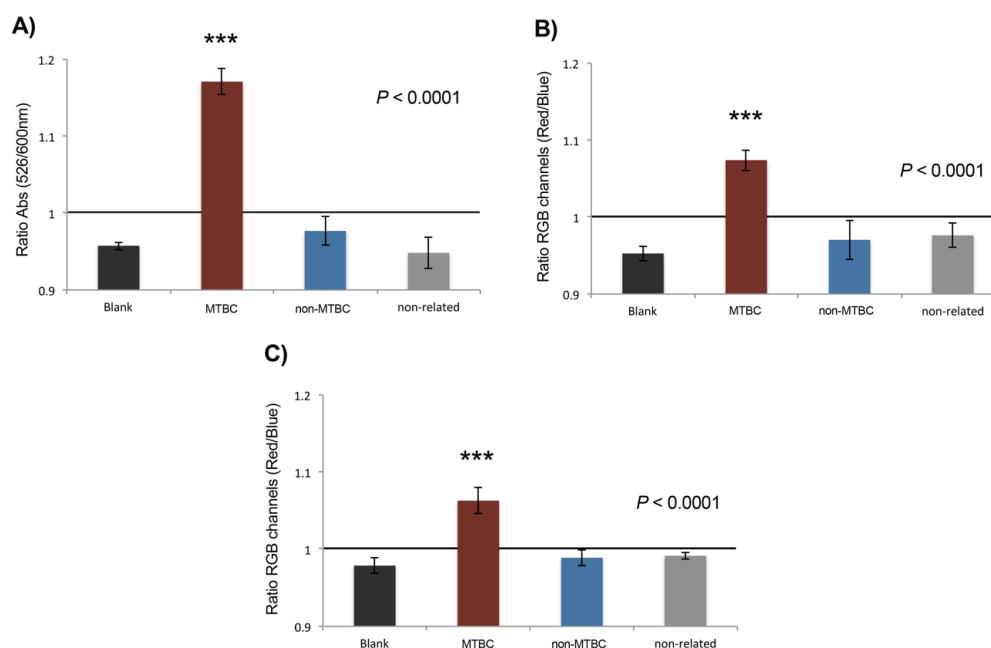


Figura 4.47: Resultados do ensaio de nanossondas para identificação de MTBC utilizando o método convencional com leitor de microplacas (A), o método da microplaca de papel e análise realizada a partir do software ImageJ (B) e com a aplicação de telemóvel ColorPikr (C).

A análise dos resultados obtidos com a microplaca de papel foi realizada através de software de análise de imagem que permite recolher a informação colorimétrica em três canais: vermelho, verde e azul (RGB). Assim, foi calculado o rácio entre a intensidade média do canal vermelho e a intensidade média do canal azul. As imagens foram capturadas com a câmara de um telemóvel e dois métodos distintos foram utilizados para a sua análise: o software ImageJ e a aplicação ColorPikr. Os resultados podem ser visualizados na Figura 4.47 B e C, respetivamente. Para todas as metodologias, validou-se o sistema de nanossondas através da identificação do ADN de *M. tuberculosis* ($p < 0.0001$). Não se verificou grande variação entre os diferentes métodos, nem perda de sensibilidade ou especificidade na análise colorimétrica realizada diretamente no telemóvel.

O ensaio com nanossondas tem a capacidade de identificar a presença de ADN do MTBC na amostra até uma concentração mínima de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, o que corresponde a 41 e 246 pmol de ADN alvo para as microplacas de papel e método convencional, respetivamente. Observou-se que, apesar de a plataforma *Gold on paper* responder ao aumento da concentração de ADN alvo, a diferença entre positivo e negativo não é tão intensa como a relatada pela técnica convencional. No entanto, a diferença apresentada é estatisticamente significativa. Esta foi a primeira vez que foi impregnado no papel o agente revelador para testes de deteção colorimétrica com nanossondas de ouro para deteção de sequências específicas de ADN. Este método, que utiliza o papel como plataforma de deteção, permite a redução do número de passos necessários à realização do protocolo de deteção e não necessita de equipamento especializado.

Após o desenvolvimento da cor, três poços correspondentes a microplaca de papel, amostra MTBC positiva e amostra MTBC negativa, foram caracterizadas por microscopia electrónica de varrimento (SEM). Os resultados são demonstrados na Figura 4.48.

Os resultados demonstraram uma clara diferença entre a dispersão das nanossondas de ouro na presença de amostras com alvo MTBC e não MTBC. A última demonstra uma extensa agregação das nanossondas sobre as fibras do papel, enquanto que na amostra positiva as nanossondas se encontram dispersas. Estes resultados estão perfeitamente correlacionados com os resultados captados fotograficamente e com a análise representada graficamente.

Baptista et al. estimou o custo dos reagentes por amostra para o método convencional [78]. Tendo em conta que o método *Gold on paper* permite a redução dos reagentes de $30 \mu\text{L}$ para $5 \mu\text{L}$, ou seja utiliza apenas um sexto do volume necessário para o método convencional, infere-se também a redução do custo dos reagentes para um sexto. Nesse caso, e incluindo o custo do papel ($127,9 \times 85,85 \text{ mm}^2$) e da impressão, calculou-se que o custo por teste seja de $6,68 \times 10^{-2} \text{ €}$.

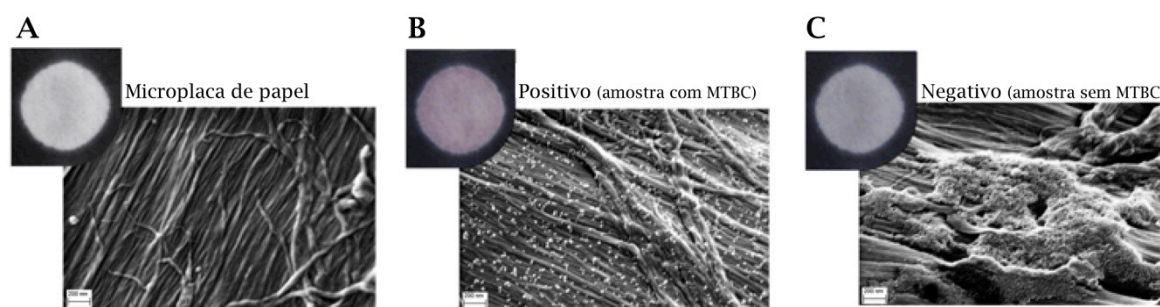


Figura 4.48: Fotografias e imagens SEM dos três tipos de poços apresentados no diagnóstico molecular *Gold on paper*: microplaca de papel (A), identificação de uma amostra positiva para o complexo *M. tuberculosis* (B) e amostra negativa para um alvo com ADN não MTBC.

4.7.4 Dispositivo para diagnóstico de leishmaniose canina

O dispositivo para diagnóstico de leishmaniose canina foi implementado de modo a reproduzir a forma e componentes de um imunoensaio de fluxo lateral disponível comercialmente. No AnexoIII.3 demonstram-se as etapas do fabrico do biossensor proposto.

O modelo descrito neste procedimento é indireto, ou seja, o teste deteta a presença de anticorpos no soro dos animais infetados, inferindo-se que a sua existência implica o contacto direto com o agente patogénico. Assim, na linha de teste encontra-se imobilizado o antígeno que é reconhecido pelos anticorpos presentes na amostra, no caso de infeção, e sinalizado por nanopartículas de ouro. As AuNPs estão funcionalizadas com proteína A, uma proteína com afinidade para a parte comum dos anticorpos de cão. Todos os anticorpos do cão estão assim combinados com as AuNPs, via proteína A. No entanto, apenas as AuNPs que se encontram ligadas a anticorpos anti-*Leishmania* vão ser imobilizadas na linha de teste, por intermédio da ligação destes anticorpos aos antígenos respetivos fixados na linha. A linha de controlo indica a validade do teste, sinalizando a passagem da solução pela linha de teste. A sua sinalização é também realizada pela proteína A marcada com AuNPs, mas ao contrário da linha de teste, é independente do resultado do teste ser positivo ou negativo. A linha de controlo contém anticorpos imobilizados aos quais se liga também a proteína A, levando à concentração das AuNPs.

A implementação das linhas de controlo e de teste passa pela deposição de reagentes em zonas específicas e bem delimitadas a meio do canal. O facto de estas regiões retangulares com cerca de 1,5 mm de comprimento não estarem delimitadas lateralmente por barreiras hidrófobas, torna a deposição dos reagentes complexa. A precisão das linhas de teste e controlo é essencial na revelação do resultado. A concentração dos reagentes numa área bem definida permite a correta sinalização e leitura dos resultados, por contraste com a região circundante. A difusão dos reagentes por uma área para além da sinalizada como linha de teste ou controlo pode levar a uma redução deste contraste e, consequentemente, a uma interpretação incorreta dos resultados.

Para resolver esta situação utilizou-se o sistema de interruptores descrito por Li et.al [21]. O sistema utilizado pode ser observado na Figura 4.49.

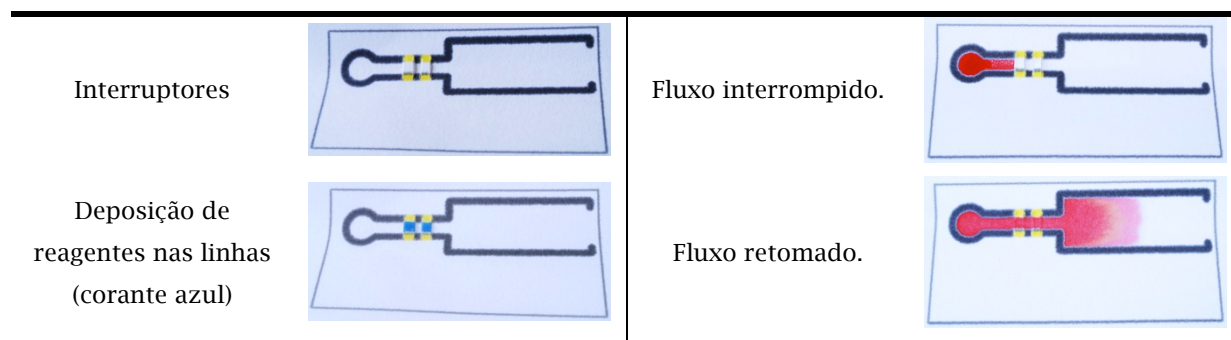


Figura 4.49: Ilustração do sistema de interruptores utilizado na deposição de reagentes nas linhas de teste e controlo.

O sucesso deste dispositivo pode ser descrito por três fases distintas: a obtenção de uma linha de teste funcional, a obtenção de uma linha de controlo funcional e finalmente, uma correta ligação no substrato entre a proteína A marcada com AuNPs e os anticorpos presentes na amostra depositada. A primeira etapa a ser implementada foi a funcionalização da linha de teste. Uma linha de teste

funcional implica uma sinalização colorimétrica, através de concentração de AuNPs na linha, no caso de uma amostra infetada e a inexistência de sinal colorimétrico na presença de amostra não infetada. Assim, de modo a evitar a inserção de variáveis ainda não estudadas, a mistura entre a amostra a ser testada e a solução de proteína A marcada foi realizada antes da deposição da amostra. Este procedimento permite inferir que o acoplamento entre os anticorpos presentes na amostra e a proteína A está a ocorrer como previsto.

Após a preparação do teste, os 20 µL, correspondentes a 10 µL de proteína A marcada e 10 µL de soro de cão (infetado ou não infetado) previamente misturados, foram adicionados à zona de deposição da amostra. Após desenvolvimento dos testes, em vários ensaios, verificou-se que apenas raramente se conseguia distinguir uma linha de teste positiva com amostras de soro infetadas. Na Figura 4.50 está ilustrado o resultado de um destes ensaios.

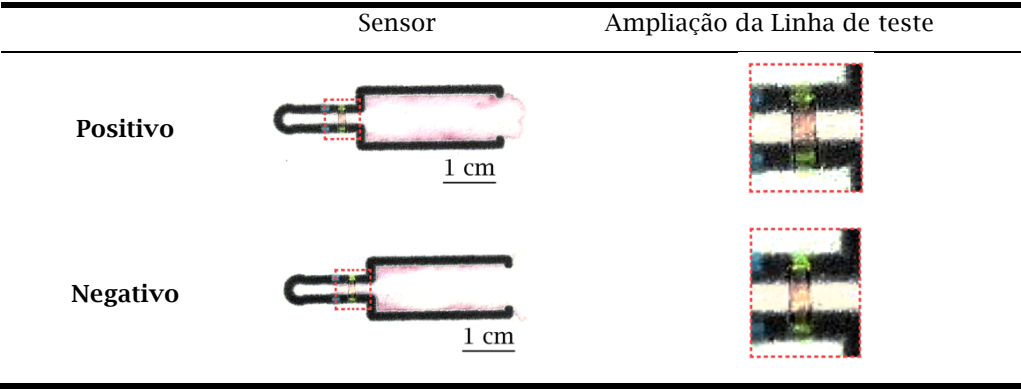


Figura 4.50: Ilustração do resultado obtido para a linha de teste com o dispositivo para diagnóstico de Leishmaniose canina.

O gráfico da Figura 4.51 representa a análise RGB efectuada a cada linha de teste (positivo e negativo) através do software ImageJ.

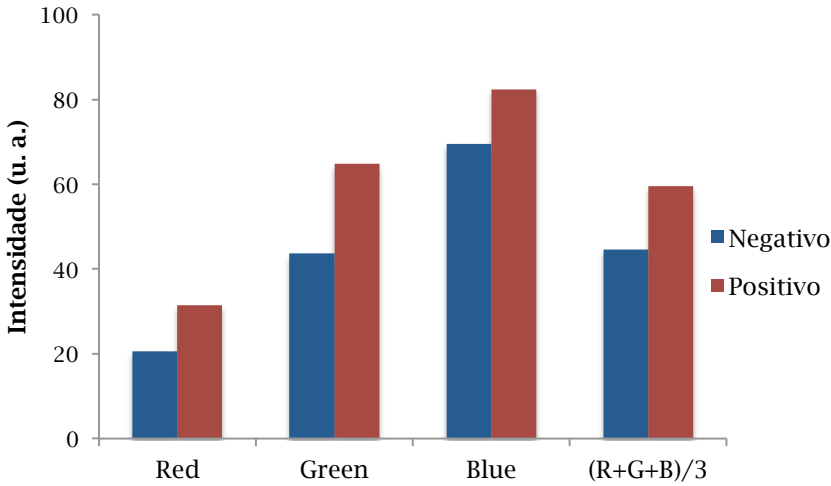


Figura 4.51: Análise RGB do resultado do dispositivo para diagnóstico de Leishmaniose canina.

Verifica-se pela análise do gráfico que a intensidade colorimétrica da linha de teste foi superior no resultado positivo em todos os canais RGB. No entanto, o resultado negativo também apresenta sinal, o que indica a presença de AuNPs na linha de teste negativa. No entanto, para a maioria dos testes

realizados, não se detetou diferença nas linhas de teste, ao serem testados soros positivos ou negativos para leishmaniose. A hipótese mais provável para este insucesso deverá prender-se com o facto de os antígenos de *Leishmania* não estarem a ser corretamente fixados na linha de teste. Os processos de imobilização de antígenos na matriz de papel por simples adsorção física, usados neste trabalho, poderão não ser assim os mais adequados para a fabricação destes dispositivos.

Por outro lado, os antígenos usados neste trabalho foram constituídos por um lisado celular de promastigotas, contendo proteínas totais não purificadas. A sensibilidade dos testes poderá ser melhorada usando-se como antígenos proteínas imunodominantes recombinantes de *Leishmania* já usadas noutros testes disponíveis comercialmente. De qualquer modo, o método de preparação do antígeno usado neste trabalho foi já anteriormente utilizado com sucesso no desenvolvimento de um ensaio serológico do tipo ELISA mas com um substrato de nitrocelulose [94], podendo-se inferir que o procedimento poderá ser válido também para papel.

A linha de controlo foi testada utilizando soluções com diferentes proporções de soro de cão e proteína A de modo a determinar qual a diluição mínima do soro na qual existe proteína A livre, que se possa ligar aos anticorpos fixos na linha de controlo. Verificou-se que para 10 μL de solução de proteína A, a diluição mínima de soro que permite a sinalização da linha de controlo é de 1:100 de soro em PBS (pH 7.4) (Figura 4.52).

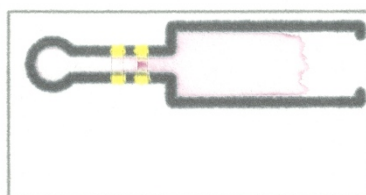


Figura 4.52: Linha de controlo.

Este ensaio permitiu ainda concluir que a fixação de anticorpos por deposição simples no papel é possível, sem a necessidade de efetuar tratamentos específicos. Concluiu-se também que a proteína A se fixa aos anticorpos do soro de cão, uma vez que utilizando diluições maiores que 1:100 a linha de controlo não era sinalizada.

Conclusões e Propostas de Trabalho Futuro

O papel é um material comum nos laboratórios principalmente pelas suas aplicações em cromatografia e filtração. Esta dissertação explora as vantagens do papel como substrato para fabrico de dispositivos de microfluídica de elevado valor acrescentado. O baixo custo, abundância e disponibilidade, elevada porosidade, biodegradabilidade e compatibilidade química com uma vasta gama de aplicações são, neste contexto, as principais vantagens do papel.

No âmbito deste trabalho usou-se papel de cromatografia Whatman nº 1. Este papel revelou uma grande capacidade de absorção de água, apresentando um ângulo de contacto de apenas 12°. As técnicas de caracterização elementar empregadas no estudo (EDS e FTIR) deste substrato revelaram que os seus principais constituintes são carbono e oxigénio. Os indícios da sua elevada pureza em celulose foram confirmados com as técnicas de análise estrutural e química (DRX e FTIR). No seu difratograma apenas foi identificada a estrutura cristalina da celulose e o seu espectro infravermelho apresentou apenas as bandas características das ligações da celulose. A caracterização térmica relevou um comportamento semelhante ao da celulose, sofrendo uma perda de massa de cerca de 70% a temperaturas entre 320 e 370 °C. Os restantes papéis analisados apresentaram características que impossibilitaram o seu uso nas aplicações desenvolvidas. Os papéis de impressão branco e reciclado revelaram-se hidrofóbicos, devido aos tratamentos superficiais e aditivos inerentes ao seu processo de fabrico. O papel de filtro de café apresentou propriedades semelhantes ao papel Whatman nº1. No entanto devido à porosidade elevada e baixa densidade de fibras revelou ser inadequado para o método de impressão a cera. A nitrocelulose é o substrato comercialmente utilizado em dispositivos imunocromatográficos de fluxo lateral, por isso foi estudado a título de comparação.

O método de impressão a cera é rápido, eficiente e barato. Os dispositivos podem ser fabricados em menos de cinco minutos (do desenho ao protótipo final). A caracterização elementar, estrutural e química efetuada a este material revelou que é composto essencialmente por parafina. A sua caracterização térmica revelou que não sofre perdas de massa significativas até temperaturas de 300 °C, o que, juntamente com o comportamento térmico do papel Whatman nº1, permite concluir que os dispositivos desenvolvidos conseguirão aguentar condições extremas antes de se degradarem.

O fabrico destes dispositivos envolve cinco etapas simples: desenho, impressão e difusão dos padrões de cera no papel seguido de deposição dos reagentes e finalmente impressão do encapsulamento. A difusão lateral da cera faz com que as dimensões finais dos dispositivos não correspondam às dimensões desenhadas. No decorrer deste trabalho obtiveram-se modelos que permitem prever com precisão as dimensões finais e, como tal facilitam o dimensionamento dos dispositivos. Determinou-se a resolução do método, que se refere à largura da barreira hidrófoba e à largura do canal hidrófilo. Verificou-se que para um processo de difusão à temperatura 120 °C e com

duração de dois minutos a barreira hidrófoba mínima é conseguida a partir de uma largura nominal de 200 μm . Determinou-se que o canal hidrófilo mínimo que é possível delimitar com o método de impressão a cera é de aproximadamente 500 μm de largura.

Muita investigação tem sido levada a cabo no sentido de providenciar plataformas de diagnóstico, particularmente de doenças generalizadas e epidemias, portáteis e robustas para aplicação em situações de carência de recursos e/ou pessoal especializado. Neste contexto, é demonstrado o potencial da plataforma *Gold on Paper* para diagnóstico de TB molecular e resultados promissores na aplicação desta tecnologia ao diagnóstico de leishmaniose canina e quantificação de glucose. A plataforma *Gold on Paper* demonstrou ser capaz de detetar diretamente membros de MTBC e, através de um *smartphone*, analisar os dados no local mantendo especificidade e sensibilidade. O seu procedimento é de fácil execução e não requer laboratórios especializados, normalmente complexos e dispendiosos. Com o mesmo conceito foi desenvolvido o dispositivo para determinação do nível de glucose em soluções, que se mostrou capaz de determinar uma gama de concentrações entre 0,01 e 40 mM. Demonstrou-se também a potencialidade da tecnologia em aplicação a diagnósticos serológicos através do diagnóstico de leishmaniose canina por reconhecimento de anticorpos anti-*Leishmania* presentes em soros de cães infetados. Foram encontrados alguns obstáculos no desenvolvimento deste dispositivo derivados do método de fixação dos agentes utilizado. Sistemas mais complexos para desempenhar esta tarefa encontram-se numa fase inicial de desenvolvimento, tanto pelo grupo de trabalho como por outros autores [7]. O dispositivo de diagnóstico de Leishmaniose canina, mediante a otimização necessária, poderá fornecer uma ferramenta de baixo custo e uso fácil no diagnóstico e monitorização desta patologia.

Num cenário onde plataformas semelhantes ao *Gold on Paper* e diagnóstico de leishmaniose desenvolvido estivessem disponíveis em larga escala, um sistema central poderia receber via rede 3G, processar e armazenar resultados e dados (posição geográfica, por exemplo) de testes efetuados, fornecendo uma poderosa ferramenta no combate a patologias generalizadas e epidemias.

A aplicação desta tecnologia não está limitada aos países em desenvolvimento, representando uma alternativa de baixo custo às atuais tecnologias de diagnóstico. Também pode revelar-se bastante útil em múltiplos contextos, podendo vir a fornecer meios de diagnóstico rápidos e baratos para uma variedade de patologias e também uma ferramenta de análise e controlo da qualidade alimentar e ambiental.

Bibliografia

- [1] J. C. Roberts, *The Chemistry of Paper*. The Royal Society of Chemistry, 1996.
- [2] N. F. de O. Correia, “Produção e caracterização de dispositivos electrocrómicos em substratos à base de celulose,” Universidade Nova de Lisboa Faculdade de Ciências e Tecnologia, 2008.
- [3] “History of Paper.” [Online]. Available: <http://en.wikipedia.org/wiki/Paper#History>.
- [4] “Paper On Web.” [Online]. Available: <http://www.paperonweb.com/>.
- [5] “Structure of Wood.” [Online]. Available: http://www.doitpoms.ac.uk/tlplib/wood/structure_wood_pt1.php.
- [6] “Cellulose.” [Online]. Available: <http://www.joostdevree.nl/shtmls/cellulose.shtml>.
- [7] R. Pelton, “Bioactive paper provides a low-cost platform for diagnostics,” *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 28, no. 8, pp. 925–942, 2009.
- [8] “Paper Making.” [Online]. Available: <http://www.britannica.com/EBchecked/topic/1357055/papermaking/>.
- [9] J. L. Velho, *Mineral Fillers for Paper Why, What, How*, 1st ed. Tomar: TECNICELPA - Portuguese Association of the Pulp and Paper Technicians, 2003.
- [10] Y. Zhu and K. Petkovic-Duran, “Capillary flow in microchannels,” *Microfluidics and Nanofluidics*, vol. 8, no. 2, pp. 275–282, Nov. 2009.
- [11] L. A. Oliveira and A. G. Lopes, *Mecânica dos Flúidos*, 2.^a Edição. Lisboa, Portugal: LIVRIMPOR - Livros Técnicos, Lda., 2007.
- [12] S. Vyawahare, *MICROFLUIDICS BOOTCAMP 2011*. Princeton: Princeton Physical Sciences-oncology Center, 2011.
- [13] H. Bruus, *Theoretical Microfluidics*. New York: Oxford University Press Inc., 2008.
- [14] E. W. Washburn, “The dynamica of Capillary flow,” *Physical Review*, vol. 17, no. 3, pp. 273–283, 1921.
- [15] R. H. Muller and D. L. Clegg, “Automatic Paper Chromatography,” *Analytical chemistry*, vol. 21, no. 9, pp. 1123–1125, 1949.
- [16] A. W. Martinez, S. T. Phillips, M. J. Butte, and G. M. Whitesides, “Patterned Paper as a Platform for Inexpensive, Low-Volume, Portable Bioassays,” *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 46, no. 8, pp. 1318–1320, 2007.
- [17] A. W. Martinez, S. T. Phillips, and G. M. Whitesides, “Three-dimensional microfluidic devices fabricated in layered paper and tape,” *PNAS*, vol. 105, no. 50, pp. 19606–19611, 2008.
- [18] D. a Bruzewicz, M. Reches, and G. M. Whitesides, “Low-cost printing of poly(dimethylsiloxane) barriers to define microchannels in paper,” *Analytical chemistry*, vol. 80, no. 9, pp. 3387–92, May 2008.
- [19] K. Abe, K. Suzuki, and D. Citterio, “Inkjet-printed paperfluidic immuni-chemical sensing device,” *Analytical and bioanalytical chemistry*, no. 398, pp. 885–893, 2010.

- [20] K. Abe, K. Suzuki, and D. Citterio, "Inkjet-printed microfluidic multianalyte chemical sensing paper.," *Analytical chemistry*, vol. 80, no. 18, pp. 6928–34, Sep. 2008.
- [21] X. Li, J. Tian, T. Nguyen, and W. Shen, "Paper-Based Microfluidic Devices by Plasma," vol. 80, no. 2008903553, pp. 9131–9134, 2008.
- [22] X. Li, J. Tian, and W. Shen, "Progress in patterned paper sizing for fabrication of paper-based microfluidic sensors," *Cellulose*, vol. 17, no. 3, pp. 649–659, Jan. 2010.
- [23] W. Wang, W.-Y. Wu, and J.-J. Zhu, "Tree-shaped paper strip for semiquantitative colorimetric detection of protein with self-calibration.," *Journal of chromatography. A*, vol. 1217, no. 24, pp. 3896–9, Jun. 2010.
- [24] Y. Lu, W. Shi, L. Jiang, J. Qin, and B. Lin, "Rapid prototyping of paper-based microfluidics with wax for low-cost, portable bioassay.," *Electrophoresis*, vol. 30, no. 9, pp. 1497–500, May 2009.
- [25] E. Carrilho, A. W. Martinez, and G. M. Whitesides, "Understanding Wax Printing: A Simple Micropatterning Process for Paper-Based Microfluidics," *Anal. Chemistry*, no. 81, pp. 7091–7095, 2009.
- [26] V. Leung, A.-A. M. Shehata, C. D. M. Filipe, and R. Pelton, "Streaming potential sensing in paper-based microfluidic channels," *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 364, no. 1–3, pp. 16–18, Jul. 2010.
- [27] B. Veigas, J. M. Jacob, M. N. Costa, D. S. Santos, M. Viveiros, J. Inácio, R. Martins, P. Barquinha, E. Fortunato, and P. V. Baptista, "Gold on paper-paper platform for Au-nanoprobe TB detection.," *Lab on a chip*, Sep. 2012.
- [28] X. Li, J. Tian, G. Garnier, and W. Shen, "Fabrication of paper-based microfluidic sensors by printing.," *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, vol. 76, no. 2, pp. 564–70, Apr. 2010.
- [29] J. Olkkonen, K. Lehtinen, and T. Erho, "Flexographically printed fluidic structures in paper.," *Analytical chemistry*, vol. 82, no. 24, pp. 10246–50, Dec. 2010.
- [30] W. Dungchai, O. Chailapakul, and C. S. Henry, "A low-cost, simple, and rapid fabrication method for paper-based microfluidics using wax screen-printing.," *The Analyst*, vol. 136, no. 1, pp. 77–82, Jan. 2011.
- [31] G. Chitnis, Z. Ding, C.-L. Chang, C. a Savran, and B. Ziaie, "Laser-treated hydrophobic paper: an inexpensive microfluidic platform.," *Lab on a chip*, vol. 11, no. 6, pp. 1161–5, Mar. 2011.
- [32] X. Li, D. R. Ballerini, and W. Shen, "A perspective on paper-based microfluidics: Current status and future trends.," *Biomicrofluidics*, vol. 6, no. 1, pp. 11301–1130113, Mar. 2012.
- [33] W. Dungchai, O. Chailapakul, and C. S. Henry, "Use of multiple colorimetric indicators for paper-based microfluidic devices.," *Analytica chimica acta*, vol. 674, no. 2, pp. 227–33, Aug. 2010.
- [34] Z. Nie, F. Deiss, X. Liu, O. Akbulut, and G. M. Whitesides, "Integration of paper-based microfluidic devices with commercial electrochemical readers.," *Lab on a chip*, vol. 10, no. 22, pp. 3163–9, Nov. 2010.
- [35] A. Apilux, W. Dungchai, W. Siangproh, N. Praphairaksit, C. S. Henry, and O. Chailapakul, "Lab-on-paper with dual electrochemical/colorimetric detection for simultaneous determination of gold and iron.," *Analytical chemistry*, vol. 82, no. 5, pp. 1727–32, Mar. 2010.
- [36] Z. Nie, C. a Nijhuis, J. Gong, X. Chen, A. Kumachev, A. W. Martinez, M. Narovlyansky, and G. M. Whitesides, "Electrochemical sensing in paper-based microfluidic devices.," *Lab on a chip*, vol. 10, no. 4, pp. 477–83, Feb. 2010.
- [37] W. Dungchai, O. Chailapakul, and C. S. Henry, "Electrochemical detection for paper-based microfluidics.," *Analytical chemistry*, vol. 81, no. 14, pp. 5821–6, Jul. 2009.
- [38] R. F. Carvalhal, M. S. Kfoury, M. H. D. O. Piazzetta, A. L. Gobbi, and L. T. Kubota, "Electrochemical detection in a paper-based separation device.," *Analytical chemistry*, vol. 82, no. 3, pp. 1162–5, Feb. 2010.

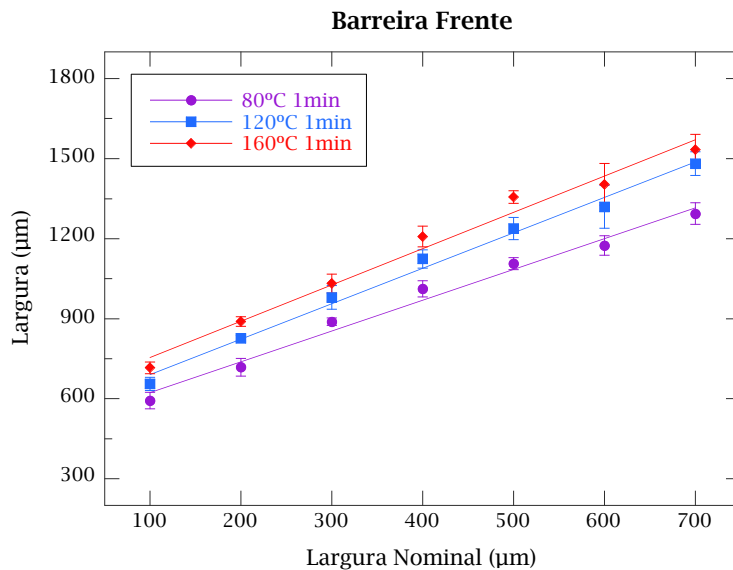
- [39] J. L. Delaney, C. F. Hogan, J. Tian, and W. Shen, "Electrogenerated chemiluminescence detection in paper-based microfluidic sensors.," *Analytical chemistry*, vol. 83, no. 4, pp. 1300–6, Feb. 2011.
- [40] J. Yu, L. Ge, J. Huang, S. Wang, and S. Ge, "Microfluidic paper-based chemiluminescence biosensor for simultaneous determination of glucose and uric acid.," *Lab on a chip*, vol. 11, no. 7, pp. 1286–91, Apr. 2011.
- [41] R. C. Wong and H. Y. Tse, *Lateral Flow Immunoassay*. Totowa, NJ: Humana Press, 2009.
- [42] National Institutes of Health, "Blood glucose monitoring," *National Library of Medicine*, 2012. [Online]. Available: <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/article/003438.htm>.
- [43] WHO, "Diabetes Fact Sheet N°312," 2012. [Online]. Available: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/index.html>.
- [44] H. Noh and S. T. Phillips, "Fluidic timers for time-dependent, point-of-care assays on paper.," *Analytical chemistry*, vol. 82, no. 19, pp. 8071–8, Oct. 2010.
- [45] K. M. Schilling, A. L. Lepore, J. a Kurian, and A. W. Martinez, "Fully enclosed microfluidic paper-based analytical devices.," *Analytical chemistry*, vol. 84, no. 3, pp. 1579–85, Feb. 2012.
- [46] A. W. Martinez, S. T. Phillips, E. Carrilho, S. W. Thomas, H. Sindi, and G. M. Whitesides, "Simple telemedicine for developing regions: camera phones and paper-based microfluidic devices for real-time, off-site diagnosis.," *Analytical chemistry*, vol. 80, no. 10, pp. 3699–707, May 2008.
- [47] WHO, *Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing*. Geneva, Switzerland: World Health Organization (WHO), 2011.
- [48] M. Larginho and P. V. Baptista, "Gold and silver nanoparticles for clinical diagnostics - From genomics to proteomics.," *Journal of proteomics*, vol. 75, no. 10, pp. 2811–23, Jun. 2012.
- [49] B. M. R. Veigas, "Au-Nanossondas Aplicação na detecção de Mycobacterium tuberculosis e Plasmodium berghei," Universidade Nova de Lisboa Faculdade de Ciências e Tecnologia, 2009.
- [50] L. M. Liz-Márzan, "Tailoring Surface Plasmons through the Morphology and Assembly of Metal Nanoparticles," *Langmuir*, no. 22, pp. 32–41, 2006.
- [51] P. K. Jain, K. S. Lee, I. H. El-Sayed, and M. a El-Sayed, "Calculated absorption and scattering properties of gold nanoparticles of different size, shape, and composition: applications in biological imaging and biomedicine.," *The journal of physical chemistry. B*, vol. 110, no. 14, pp. 7238–48, Apr. 2006.
- [52] K. a Willets and R. P. Van Duyne, "Localized surface plasmon resonance spectroscopy and sensing.," *Annual review of physical chemistry*, vol. 58, pp. 267–97, Jan. 2007.
- [53] C. S. Thaxton, D. G. Georganopoulou, and C. a Mirkin, "Gold nanoparticle probes for the detection of nucleic acid targets.," *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, vol. 363, no. 1–2, pp. 120–6, Jan. 2006.
- [54] P. Baptista, E. Pereira, P. Eaton, G. Doria, A. Miranda, I. Gomes, P. Quaresma, and R. Franco, "Gold nanoparticles for the development of clinical diagnosis methods.," *Analytical and bioanalytical chemistry*, vol. 391, no. 3, pp. 943–50, Jun. 2008.
- [55] C. Lee and D. Meisel, "Adsorption and Surface-Enhanced Raman of Dyes on Silver and Gold Sols'," *J. Phys. Chem.*, no. 86, pp. 3391–3395, 1982.
- [56] J. J. Storhoff, R. Elghanian, R. C. Mucic, C. A. Mirkin, and R. L. Letsinger, "One-Pot Colorimetric Differentiation of Polynucleotides with Single base imperfections using gold nanoparticle probes," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 120, no. 9, pp. 1959–6, 1998.
- [57] C. S. Duarte, "LEISHMANIOSE: QUE FUTURO NOS RESERVA?," Universidade do Porto Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, 2009.

- [58] WHO, "Leishmaniasis," 2012. [Online]. Available: <http://www.who.int/leishmaniasis/en/index.html>.
- [59] F. Chappuis, S. Sundar, A. Hailu, H. Ghalib, S. Rijal, R. W. Peeling, J. Alvar, and M. Boelaert, "Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control?," *Nature reviews. Microbiology*, vol. 5, no. 11, pp. 873–82, Nov. 2007.
- [60] C. Maia and L. Campino, "Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection.," *Veterinary parasitology*, vol. 158, no. 4, pp. 274–87, Dec. 2008.
- [61] A. El-Moamly, M. El-Sweify, and M. Hafeez, "Performance of rK39 immunochromatography and freeze-dried direct agglutination tests in the diagnosis of imported visceral leishmaniasis.," *Parasitology research*, vol. 110, no. 1, pp. 349–54, Jan. 2012.
- [62] J. M. Burns, W. G. Shreffler, D. R. Benson, H. W. Ghalib, R. Badaro, and S. G. Reed, "Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 90, no. 2, pp. 775–9, Jan. 1993.
- [63] C. R. Brundle, C. A. Evans, and S. Wilson, *Encyclopedia of Materials Characterization*. Greenwich: Manning Publications Co., 1992.
- [64] D. K. Schroder, *Semiconductor Material and Device Characterization*, Third Edit. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2006.
- [65] P. Echlin, *Handbook of Sample Preparation for Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis*. New York: Springer Science+Business Media, LLC, 2009.
- [66] D. E. Newbury, D. C. Joy, C. E. Lyman, P. Echlin, E. Lifshin, J. R. Michael, J. I. Goldstein, and L. Sawyer, *Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis*, Third Edit. New York: Luwer Academic/Plenum Publishers, 2003.
- [67] B. Cullity, "Elements of X-ray Diffraction," 2001.
- [68] C. Hammond, *The Basics of Crystallography and Diffraction*, Third edit. Oxford University Press Inc., 2009.
- [69] R. Silverstein, F. Webster, and D. Kiemle, "Spectrometric Identification of Organic Compounds." John Wiley & Sons, Inc., 2005.
- [70] J. Clayden, N. Greeves, S. Warren, and P. Wothers, *Organic Chemistry*. .
- [71] T. Hatakeyama and F. X. Quinn, *Thermal Analysis Fundamentals and Applications to Polymer Science*, Second Edi. Chichester, West Sussex, England: John Wiley & Sons, Inc.
- [72] B. Wunderlich, *Thermal Analysis of Polymeric Materials*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2005.
- [73] C. Schick, "Differential scanning calorimetry (DSC) of semicrystalline polymers.," *Analytical and bioanalytical chemistry*, vol. 395, no. 6, pp. 1589–611, Nov. 2009.
- [74] L. Szcześniak, A. Rachocki, and J. Tritt-Goc, "Glass transition temperature and thermal decomposition of cellulose powder," *Cellulose*, vol. 15, no. 3, pp. 445–451, Nov. 2007.
- [75] "Contact Angle." [Online]. Available: http://en.wikipedia.org/wiki/Contact_angle#Thermodynamics.
- [76] M. J. Moura, P. J. Ferreira, and M. M. Figueiredo, "Mercury intrusion porosimetry in pulp and paper technology," *Powder Technology*, vol. 160, no. 2, pp. 61–66, Dec. 2005.
- [77] L. Kreilgaard, S. Frokjaer, J. M. Flink, T. W. Randolph, and J. F. Carpenter, "Effects of Additives on the Stability of *Humicola lanuginosa* Lipase during Freeze-Drying and Storage in the Dried Solid," *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 88, no. 3, pp. 281–290, 1999.

- [78] P. V. Baptista, M. Koziol-Montewka, J. Paluch-Oles, G. Doria, and R. Franco, "Gold-nanoparticle-probe-based assay for rapid and direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in clinical samples.," *Clinical chemistry*, vol. 52, no. 7, pp. 1433–4, Jul. 2006.
- [79] B. Veigas, G. Doria, and P. V. Baptista, "Nanodiagnostics for Tuberculosis, Understanding Tuberculosis-Global Experiences and Innovative Approaches to the Diagnosis," D. P.-J. Cardona, Ed. InTech, 2012, pp. 257–276.
- [80] B. Veigas, D. Machado, J. Perdigão, I. Portugal, I. Couto, M. Viveiros, and P. V. Baptista, "Au-nanoprobes for detection of SNPs associated with antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis*.,” *Nanotechnology*, vol. 21, no. 41, p. 415101, Oct. 2010.
- [81] M. Le Troëdec, C. S. Peyratout, A. Smith, and T. Chotard, "Influence of various chemical treatments on the interactions between hemp fibres and a lime matrix,” *Journal of the European Ceramic Society*, vol. 29, no. 10, pp. 1861–1868, Jul. 2009.
- [82] V. Tserki, N. E. Zafeiropoulos, F. Simon, and C. Panayiotou, "A study of the effect of acetylation and propionylation surface treatments on natural fibres,” *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*, vol. 36, no. 8, pp. 1110–1118, Aug. 2005.
- [83] S. Borysiak and B. Doczekalska, "X-ray Diffraction Study of Pine Wood Treated with NaOH,” *Europe*, vol. 13, no. 5, pp. 87–89, 2005.
- [84] M. C. Silva, O. R. Lopes, J. L. Colodette, a. O. Porto, J. Rieumont, D. Chaussy, M. N. Belgacem, and G. G. Silva, "Characterization of three non-product materials from a bleached eucalyptus kraft pulp mill, in view of valorising them as a source of cellulose fibres,” *Industrial Crops and Products*, vol. 27, no. 3, pp. 288–295, May 2008.
- [85] M. Moniruzzaman, J. M. Bellerby, and N. Mai, "The effect of light on the viscosity and molecular mass of nitrocellulose,” *Polymer Degradation and Stability*, vol. 96, no. 5, pp. 929–935, May 2011.
- [86] S. Dumitriu, Ed., *Polysaccharides: Structural Diversity and Functional Versatility*, Second Edi. New York: Marcel Dekker, 1998.
- [87] K. K. Pandey, "A Study of Chemical Structure of Soft and Hardwood and Wood Polymers by FTIR Spectroscopy,” *Polymer*, vol. 71, no. May, pp. 1969–1975, 1998.
- [88] a Synytsya, "Fourier transform Raman and infrared spectroscopy of pectins,” *Carbohydrate Polymers*, vol. 54, no. 1, pp. 97–106, Oct. 2003.
- [89] "Whatman Chromatography Paper.” [Online]. Available: <http://www.whatman.com/ChromatographyPaper.aspx>.
- [90] A. K. Ellerbee, S. T. Phillips, A. C. Siegel, K. a Mirica, A. W. Martinez, P. Striehl, N. Jain, M. Prentiss, and G. M. Whitesides, "Quantifying colorimetric assays in paper-based microfluidic devices by measuring the transmission of light through paper.,” *Analytical chemistry*, vol. 81, no. 20, pp. 8447–52, Oct. 2009.
- [91] A. W. Martinez, S. T. Phillips, B. J. Wiley, M. Gupta, and G. M. Whitesides, "FLASH: A rapid method for prototyping paper-based microfluidic devices,” *Lab on a Chip*, no. 8, pp. 2146–2150, 2008.
- [92] C. Wayne Jaeger, "How does a solid ink printer work?” [Online]. Available: http://www.imaging.org/ist/resources/tutorials/solid_ink.cfm.
- [93] Xerox Corporation, "Xerox Solid Ink Print Process.” [Online]. Available: http://www.office.xerox.com/solid-ink/ptpt.html#_print_process.
- [94] H. D. F. H. Schallig, L. Cardoso, M. Hommers, N. Kroon, G. Belling, M. Rodrigues, S. J. Semia, and H. Vetter, "Development of a Dipstick Assay for Detection of *Leishmania*-Specific Canine Antibodies,” vol. 42, no. 1, pp. 193–197, 2004.

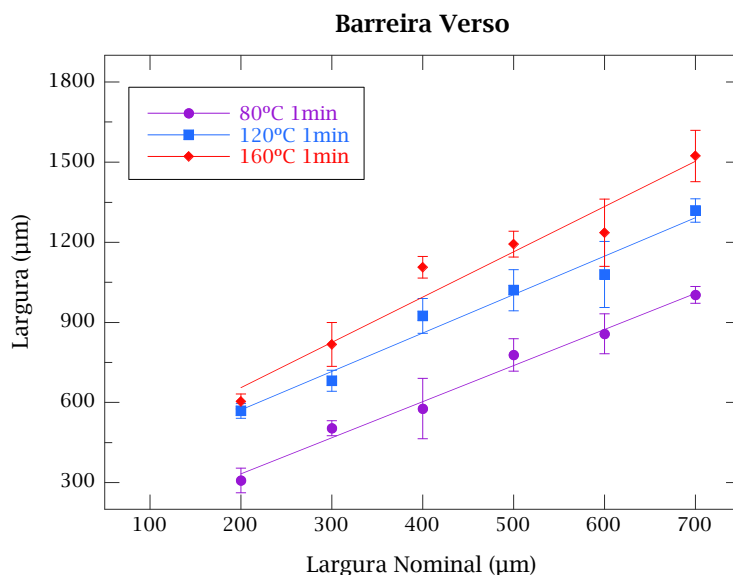
Anexos

Anexo I – Influência da temperatura do processo de difusão da cera na largura da barreira hidrófoba.



T (°C)	Regressão Linear	R ²
80	$L_B = 507,93 + 1,154L_N$	0,99205
100	$L_B = 584,17 + 1,3245L_N$	0,98459
120	$L_B = 558,07 + 1,3282L_N$	0,99539
140	$L_B = 584,17 + 1,3245L_N$	0,98459
160	$L_B = 618,95 + 1,3595L_N$	0,99127

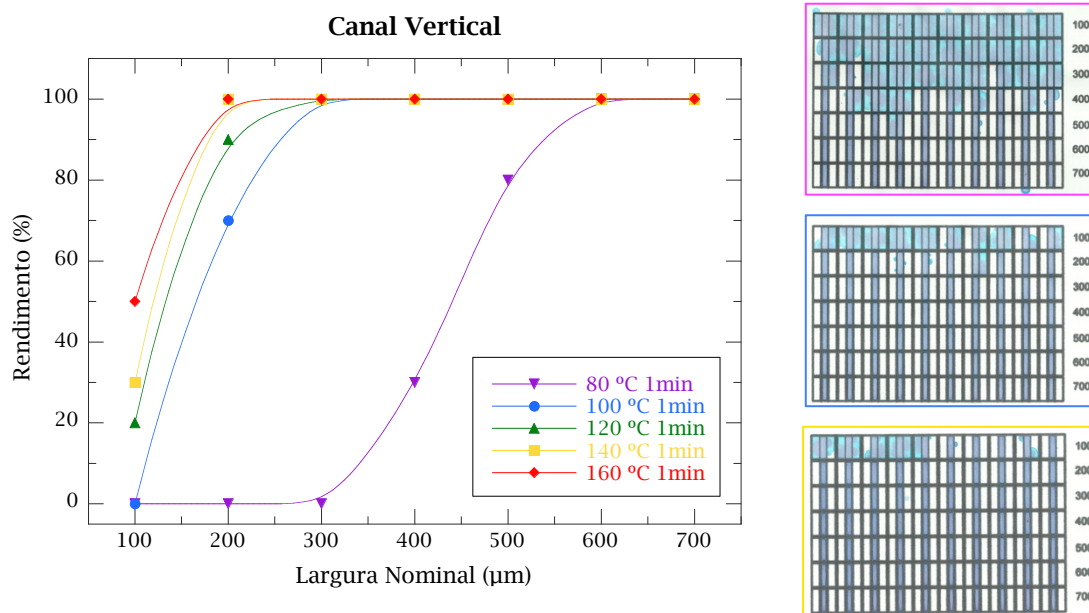
AnexoI.1: Demonstração gráfica da influência da temperatura do processo de difusão da cera, com duração de um minuto, na largura das barreiras na frente do papel.



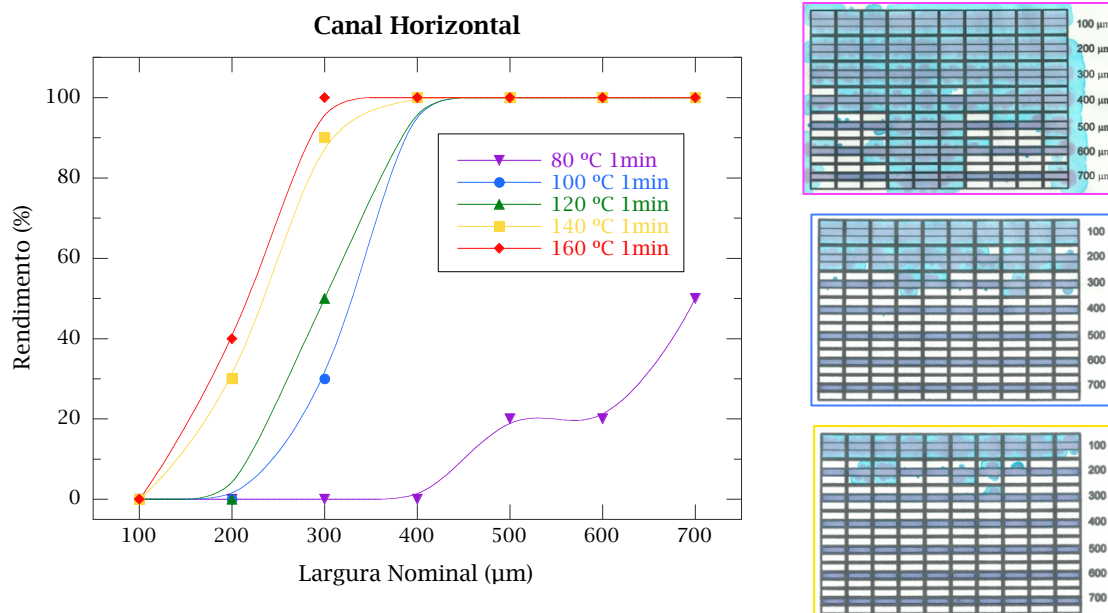
T (°C)	Regressão Linear	R ²
80	$L_B = 62,711 + 1,3525L_N$	0,9931
100	$L_B = 355,67 + 1,2329L_N$	0,9835
120	$L_B = 284,04 + 1,4405L_N$	0,9852
140	$L_B = 426,91 + 1,2485L_N$	0,97315
160	$L_B = 316,84 + 1,6956L_N$	0,97508

AnexoI.2: Demonstração gráfica da influência da temperatura do processo de difusão da cera, com duração de um minuto, na largura das barreiras no verso do papel.

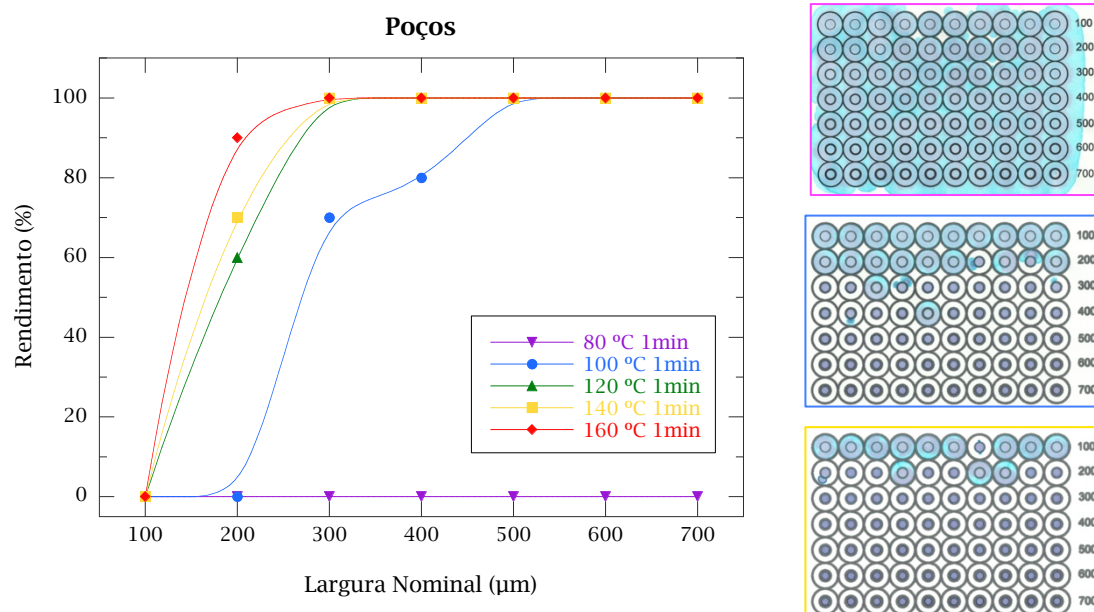
Anexo II – Rendimento das barreiras em função da largura nominal para processos de difusão com duração de um minuto.



AnexoII.1: Rendimento de barreiras verticais em função da largura nominal para processos de difusão a diferentes temperaturas e duração de um minuto.

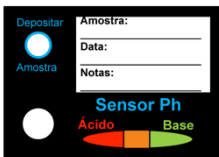
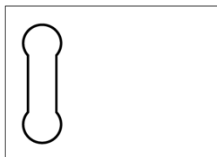
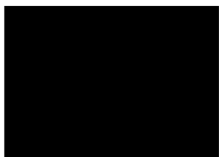
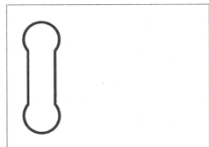



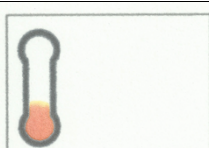

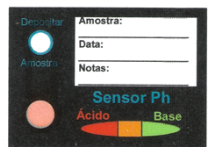



AnexoII.2: Rendimento de barreiras horizontais em função da largura nominal para processos de difusão a diferentes temperaturas e duração de um minuto.


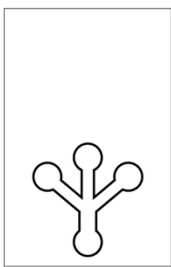

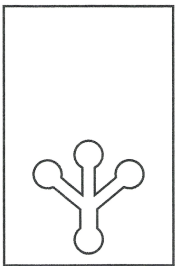

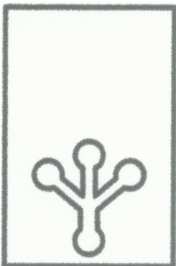
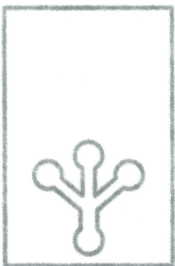

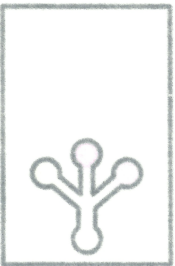
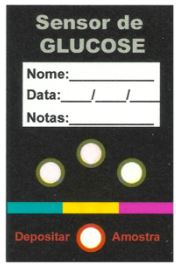



AnexoII.3: Rendimento dos poços em função da largura nominal para processos de difusão a diferentes temperaturas e duração de um minuto.

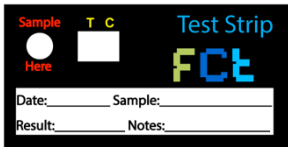
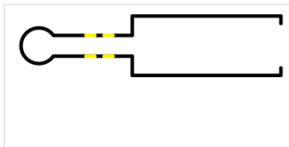
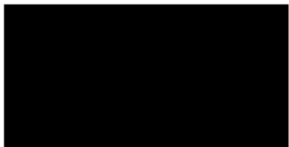
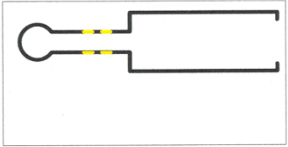

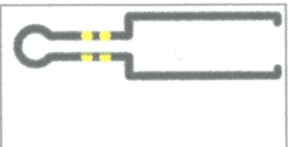
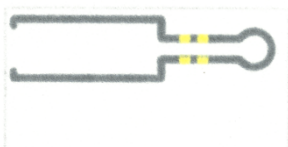
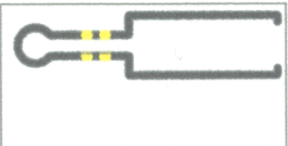
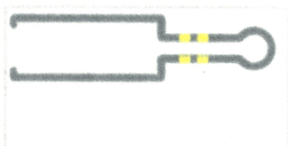
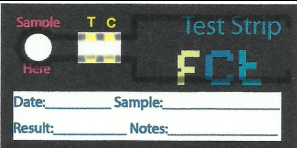

Anexo III – Imagens obtidas durante a fabricação dos diferentes sensores estudados.

	Frente	Canal	Verso
1 Desenho dos padrões.			
	Frente	Verso	
2 Impressão do canal. Qualidade: Foto			
3 Difusão do canal Temperatura 140°C Tempo 120 s			
4 Deposição dos reagentes Foram depositados 2 µL de solução de pH universal na zona de teste.			
5 Impressão das camadas de encapsulamento frente e verso. Qualidade: Foto			

AnexoIII.1: Diferentes etapas da fabricação do sensor de pH.

	Frente	Canal	Verso
1 Desenho dos padrões.	 1 cm	 1 cm	 1 cm
2 Impressão do canal. Qualidade: Foto	 1 cm		 1 cm
3 Difusão do canal Temperatura: 140°C Tempo: 2 min	 1 cm		 1 cm
4 Deposição dos reagentes Foi depositado 1 µL de cada indicador nas zonas de teste correspondente e 1 µL da solução enzimática em todas as zonas de teste.	 1 cm		 1 cm
5 Impressão das camadas de encapsulamento frente e verso. Qualidade: Foto	 1 cm		 1 cm

AnexoIII.2: Diferentes etapas da fabricação do sensor de glucose.

	Frente	Canal	Verso
1 Desenho dos padrões.	 1 cm	 1 cm	 1 cm
2 Impressão do canal. Qualidade: Foto	 1 cm		 1 cm
3 Difusão do canal Temperatura 140°C Tempo 120 s	 1 cm		 1 cm
4 Deposição dos reagentes Foram depositados 50 µL de antígeno na linha de teste e 5 µL de anticorpo anti-cão na linha de controle	 1 cm		 1 cm
5 Impressão das camadas de encapsulamento frente e verso. Qualidade: Foto	 1 cm		 1 cm

AnexoIII.3: Diferentes etapas da fabricação do teste de diagnóstico de Leishmaniose canina.

Anexo IV – Publicação obtida durante o decorrer do projeto de mestrado.

Revista:

Lab on a Chip (IF: 6.5)

Título:

Gold on paper – paper platform for Au-nanoprobes TB detection

Cite this: DOI: 10.1039/c2lc40739f

www.rsc.org/loc

PAPER

Gold on paper—paper platform for Au-nanoprobe TB detection†

Bruno Veigas,^{ab} Jorge M. Jacob,^b Mafalda N. Costa,^b David S. Santos,^b Miguel Viveiros,^c João Inácio,^d Rodrigo Martins,^b Pedro Barquinha,^b Elvira Fortunato^{*b} and Pedro Viana Baptista^{*a}

Received 29th June 2012, Accepted 29th August 2012

DOI: 10.1039/c2lc40739f

Tuberculosis (TB) remains one of the most serious infectious diseases in the world and the rate of new cases continues to increase. The development of cheap and simple methodologies capable of identifying TB causing agents belonging to the *Mycobacterium tuberculosis* Complex (MTBC), at point-of-need, in particular in resource-poor countries where the main TB epidemics are observed, is of paramount relevance for the timely and effective diagnosis and management of patients. TB molecular diagnostics, aimed at reducing the time of laboratory diagnostics from weeks to days, still require specialised technical personnel and labour intensive methods. Recent nanotechnology-based systems have been proposed to circumvent these limitations. Here, we report on a paper-based platform capable of integrating a previously developed Au-nanoprobe based MTBC detection assay—we call it “Gold on Paper”. The Au-nanoprobe assay is processed and developed on a wax-printed microplate paper platform, allowing unequivocal identification of MTBC members and can be performed without specialised laboratory equipment. Upon integration of this Au-nanoprobe colorimetric assay onto the 384-microplate, differential colour scrutiny may be captured and analysed with a generic “smartphone” device. This strategy uses the mobile device to digitalise the intensity of the colour associated with each colorimetric assay, perform a Red Green Blue (RGB) analysis and transfer relevant information to an off-site lab, thus allowing for efficient diagnostics. Integration of the GPS location metadata of every test image may add a new dimension of information, allowing for real-time epidemiologic data on MTBC identification.

1 Introduction

Tuberculosis (TB) is mainly caused by *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*, Mtb), a member of the *M. tuberculosis* Complex (MTBC) and, according to the World Health Organisation, it remains one of the most serious infectious diseases in the world, responsible for 1.1 million deaths and 8.8 million new cases in 2010 alone.¹ Recent advances in molecular diagnostics of TB have improved the detection capability of the pathogen but many of these methods require specialised technical personnel and expensive laboratory equipment.^{2–6} Several new technologies are under development, which will enable the presumptive detection of MTBC in just one to two days. Diagnostics at point-of-need is crucial to TB control as rapid identification and pathogen

characterisation may allow patients to get immediate treatment that is vital in addressing this pandemic.

Recently, there have been reports on paper-based analytical systems suitable for application in diagnostics at point-of-need.^{7–10} An interesting approach combines the use of inexpensive paper-based platforms and digital image analysis to screen for relevant analytes.¹¹ This concept makes use of quantitative colorimetric correlations using mobile cameras to digitalise results allowing the measurement of colour intensity, *i.e.* to conduct quantitative microscale bioanalysis assays without expensive laboratory equipment. Recently, Carrilho and colleagues extended this concept *via* multizone standard 384-well paper microplates to be used as an alternative to conventional multiwell plates fabricated in moulded polymers.^{12,13} Paper-based plates are functionally related to plastic well plates, and offer interesting capabilities, such as (i) multiplex assays; (ii) the ability to store, mix, and combine reagents; (iii) multiple sample assaying with a single device; and (iv) the ability to capture the result in a digital image format with a generic mobile device. The fabrication process involves two core operations: printing patterns of wax on the surface of the paper and melting the wax into the paper to form complete hydrophobic barriers. Only just have paper platforms been used for gold nanoparticle based surface enhanced Raman scattering (SERS) bio-detection assays.^{14,15}

^aCIGMH, Departamento de Ciências da Vida, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Campus de Caparica, 2829-516 Caparica, Portugal. E-mail: pmvb@fct.unl.pt; Fax: + 351 21 294 8530

^bCENIMAT/IBN, Departamento de Ciência dos Materiais, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Campus de Caparica, 2829-516 Caparica, Portugal. E-mail: emf@fct.unl.pt

^cGrupo de Micobactérias, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa, Portugal

^dInstituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, IP, Lisboa, Portugal

† Electronic Supplementary Information (ESI) available: See DOI: 10.1039/c2lc40739f

Despite the wide range of nanoscale systems for biomolecular assays,^{16–18} those based on nanoparticles, and gold nanoparticles (AuNPs) in particular, have been the most widely used for TB diagnostics.^{19–22} These AuNPs exhibit amazing properties, such as intense colours and ease of functionalisation with relevant biomolecular moieties for bio-recognition, *e.g.* antibodies and ssDNA oligonucleotides. Solutions containing AuNPs usually exhibit an intense red colour derived from the surface plasmon resonance (SPR) band centred around 520 nm; AuNP aggregation results in a red-shift of the SPR and the solution changes colour to blue.²³ The first use of such properties for the detection of *M. tuberculosis* was introduced by our group in 2006 in an assay that relied on the colorimetric changes of a solution containing AuNPs functionalised with thiol-modified ssDNA oligonucleotides (Au-nanoprobe) complementary to a region of the RNA polymerase beta subunit *locus* capable of identifying MTBC members.²⁰ The method relies on the hybridisation between the Au-nanoprobe and the target sequence from the pathogen. In this non-cross-linking assay, the aggregation of the AuNPs is induced by salt addition and the presence of a complementary target prevents Au-nanoprobe aggregation and the solution remains red; the absence of a complementary target does not prevent Au-nanoprobe aggregation, which results in a visible colour change from red to blue. This low-complexity

assay was subsequently used for the detection of MTBC specimens and mutations associated with antibiotic resistance in clinical specimens with remarkable sensitivity in just a few hours.^{20,22,24}

Here, we report on the integration of this colorimetric Au-nanoprobe assay with a paper-platform that allows colour development and a simple data analysis tool capable of the specific detection of MTBC members. The Au-nanoprobe hybridisation to the specific DNA target sequence yields an intensive red-colour that can be easily differentiated from a non-complementary sequence, which yields a blue coloured solution. The wax printed 384 well plate is impregnated with a pre-determined concentration of salt (MgCl_2) capable of inducing Au-nanoprobe aggregation, thus yielding a colorimetric discrimination indicating the presence of the specific DNA target. Because of the white background of the paper, the colour contrast is greatly improved without the need for expensive constituents. We further demonstrate the integration of this paper-platform with a smartphone and a simple data analysis tool that together are capable of quantifying the colorimetric changes on the paper plate system and transmitting the metadata to a centralised off-site laboratory (Fig. 1). This principle can be extended to any other standard mobile imaging device with GPS capability. This integrated *Gold on Paper* platform was then used

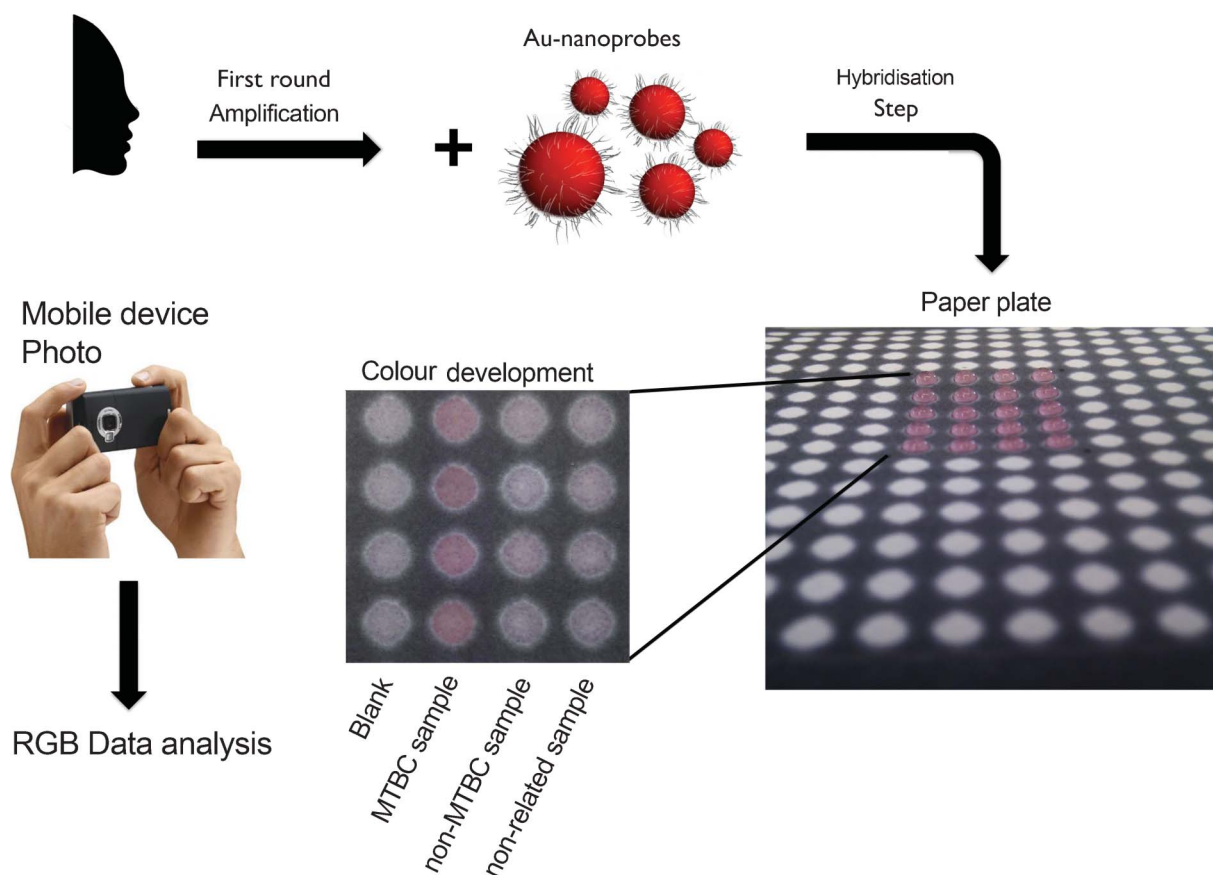


Fig. 1 Au-Nanoprobe strategy for the detection of MTBC members. Schematic representation of the detection with gold nanoprobes. The colorimetric assay consists of visual comparisons of test solutions after salt induced Au-nanoprobe aggregation on a $[\text{MgCl}_2]$ impregnated paper plate: MTBC Au-nanoprobe alone—Blank; MTBC Au-nanoprobe in the presence of MTBC sample—*M. tuberculosis*; MTBC Au-nanoprobe in the presence of a non-MTBC sample; and MTBC Au-nanoprobe in the presence of a non-complementary sample—non-related. After colour development a photo of the paper plate is captured and RGB image analysis is performed.

for the identification of DNA from MTBC. This novel integrated platform—*Gold on Paper*—holds great promise for a fast and cheap molecular diagnostics strategy for TB diagnostics at point-of-need. For the first time, a nanodiagnostics approach for the molecular characterisation of TB is combined with a simple paper based platform for use as a tool for the unequivocal identification of *Mycobacterium tuberculosis* in an easy to use lab-on-paper strategy. The integration of the *Gold on Paper* platform with the data analysis strategy on a mobile device may be proven as an effective simple approach to TB molecular screening in less than 2 h.

2 Materials and methods

2.1 Gold on Paper platform preparation

Starting from sheets of a cellulose substrate Whatman No. 1 Chromatography paper (Whatman International Ltd., Floram Park, NJ, USA), A5 standard format (210 × 148 mm) sheets were cut. This paper size fits directly into the manual feed tray of a commercial solid ink printer (Xerox ColorQube 8570, Xerox Corporation, Norwalk, CT, USA) designed to print a wax based ink, originating hydrophobic barriers.¹³ Paper microplates were designed with a standard 384 plate format in Microsoft Office Visio® (Microsoft Corporation, US). All the measurements were taken from the “Microplate Dimensions Guide, Compendium of Greiner Bio-one microplates” (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Germany). The printed pattern of a 384 microplate was placed on a hot plate (Heidolph MR Hei-Tec, Schwabach, Germany) at 140 °C for 2 min, allowing the wax to melt and spread vertically through the whole thickness of the paper, creating the desired hydrophobic pattern—see the ESI for production and characterisation.†

Each well was impregnated with 1 µL of a 0.12 M MgCl₂ solution (revelation agent) and allowed to dry at 25 °C for 10 min. The final microplates were stored at 25 °C, and wrapped in aluminium foil until use.

2.2 Scanning electron microscopy (SEM) analysis

Samples were mounted on aluminium stubs with carbon tape and coated with an 8 nm thick palladium-gold film in a Quorum Q150T ES sputtering system. The sample surface was observed in a Carl Zeiss AURIGA Crossbeam SEM-FIB workstation, using an accelerating voltage of 2 KeV with an aperture size of 30 microns.

2.3 Sample DNA preparation

A specific Polymerase Chain Reaction (PCR)-amplified 395 bp fragment of the *M. tuberculosis* RNA polymerase β-subunit (*rpoB*-GenBank accession no. L27989) gene suitable for detection of MTBC members was used as target for the Au-nanoprobe detection assay. PCR amplification was performed in a final volume of 50 µL containing 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 2.2 mM MgCl₂, 200 mM of each dNTP, and 1 U of *Taq* DNA polymerase (Amersham Biosciences, GE Healthcare, Europe, GmbH), 10 pmol of each primer (P1 5'-GAG AAT TCG GTC GGC GAG CTG ATC C-3'; P2 5'-CGA AGC TTG ACC CGC GCG TAC ACC-3')^{3,25} involving 35 cycles of 45 s denaturation at 94 °C, 45 s annealing at 58 °C followed by 45 s

extension at 72 °C. Amplification was observed by 1% Agarose gel electrophoresis and was further confirmed by direct sequencing using Big Dye v3.1 Terminator technology (STABVIDA, Almada, Portugal). DNA samples isolated from *M. tuberculosis* and non-MTBC Mycobacteria cultures were used as positive MTBC (complementary) and non-MTBC (non-complementary) samples, respectively. DNA from an unrelated organism was used as non-related. The non-MTBC sample is derived from a clinical isolate from *Mycobacterium kansasii*, whose sequence differs from that of the *M. tuberculosis rpoB* target region by a single nucleotide (see the ESI†).

2.4 Au-nanoprobe synthesis and characterisation

Gold nanoparticles, with an average diameter of ~14 nm, were synthesised by the citrate reduction method described by Lee and Meisel.²⁶ Briefly, 250 ml of 1 mM HAuCl₄ was heated while stirring, 25 ml of 28.8 mM sodium citrate was added, and the solution was refluxed for 15 min. Afterwards, the solution was left at room temperature to cool down. The gold nanoprobes were prepared by incubating the thiol-modified oligonucleotides with the AuNPs for 16 h. The solution was washed with 10 mM phosphate buffer (pH 8), and increasing salt concentration, in order to reduce non-specific binding between the thiol-modified oligonucleotides and the AuNPs. The solution was centrifuged, the resulting pellet resuspended in 10 mM phosphate buffer (pH 8), 0.1 M NaCl, and stored in the dark at 4 °C until further use.²⁷

A comparative analysis of *rpoB* gene sequences from mycobacteria was performed through sequence alignment using Geneious v.4.7.6 software. Probe specificity was tested *in silico* using BLAST tools from GenBank. The MTBC probe 5'-thiol-GAT CGC CTC CAC GTC C-3' (STABVIDA, Portugal) was then used to functionalise the AuNPs as previously described.^{20,22} For target discrimination assessment in assay calibration, non-modified synthetic oligonucleotides were used, MTBC sequence 5'-GGA GAT TGG TTT TGA CGT TTA TGT GGA CGT GGA GGC GAT C-3'; and non-MTBC 5'-GGA GAT TGG TTT TGA CGT TTA TGT GGA TCG CCT CCA CGT C) positive (complementary) and negative (non-complementary), respectively. These calibration data were used to assess the probe specificity in the presence of the DNA sample.

2.5 Au-nanoprobe colorimetric assay

The 395 base pair (bp) PCR products were ethanol precipitated, resuspended in deionised water and used for the Au-nanoprobe assay (see also the ESI†). Each colorimetric assay was performed in a total volume of 30 µL, with Au-nanoprobes at a final concentration of 2.5 nM in 10 mM phosphate buffer (pH 8), 0.1 M NaCl and target DNA at a final concentration of 30 µg ml⁻¹, as previously described.^{20,22} The assay involves the visual comparison of a “Blank” (without DNA), 10 mM phosphate buffer (pH 8), 0.1 M NaCl; “Probe”, 10 mM phosphate buffer (pH 8); and the samples. After 10 min at 95 °C for target DNA denaturation, the mixtures were allowed to stand for 30 min at room temperature and MgCl₂ was added-[MgCl₂] = 0.02 M for the MTBC probe. After 30 min at room temperature, for colour development, the mixtures and the blank were assayed by UV/visible spectroscopy in a microplate reader (Tecan Infinite M200).

For assaying with the *Gold on Paper* platform, a total reaction mixture of 5 μL was used with 2.5 nM Au-nanoprobe in 10 mM phosphate buffer (pH 8), 0.1 M NaCl and target DNA at a final concentration of 30 $\mu\text{g ml}^{-1}$. After 10 min of denaturation at 95 $^{\circ}\text{C}$, the mixtures were allowed to stand for 10 min at room temperature and spotted onto the well on the paper plate. After 45 min at room temperature for colour development, the paper plate was photographed with a mobile device and RGB analysis was performed.

2.6 Data acquisition and analysis

The colour pattern on the *Gold on Paper* was captured with an HTC Desire android smartphone with a 5 megapixel camera (2592 \times 1944 pixels) with autofocus. Photos were taken with artificial white light without flash. Blank test spots with 10 mM phosphate buffer (pH 8), were used to normalise the data for light conditions. The digitalised data were then analysed without further manipulation with a free RGB analysis application (ColorPikr, WiseClue) and transmitted via a 3G network to a personal computer for image processing with ImageJTM. Each assay was repeated at least three times and on four different paper micro well plates.

A one-way ANOVA analysis, with Tukey's multiple comparison test, using GraphPad (San Diego, CA) was used to validate the results. The one-way analysis of variance was used to test for differences between two groups of data (Blank, MTBC sample, non-MTBC sample and non-related). Additional statistical analysis of the differences was carried out using Tukey's multiple comparison procedures.

3 Results and discussion

The *Gold on Paper* diagnostics strategy is depicted in Fig. 1. First, the Au-nanoprobe is incubated with the sample DNA for molecular recognition to take place. Then, the reaction mixture is spotted onto the paper microplate well for colour revelation. The colour change on the spots is then recorded by means of a camera on the generic mobile device and subsequently analysed via RGB.

To develop the *Gold on Paper* platform, we first optimised the Au-nanoprobe detection scheme for specific identification of DNA from *M. tuberculosis* (MTBC member). A specific Au-nanoprobe, targeting the *rpoB* locus shared by all MTBC members, was synthesised and optimised for use in the non-cross-linking detection method previously reported by our group.^{20,22,28}

A minimum of three individual parallel hybridisation experiments targeting the 395 bp amplicons derived from the *rpoB* gene were performed. The Au-nanoprobe solutions exhibit a strong red colour derived from the localised SPR of the AuNPs. Upon salt induced aggregation, the presence of the complementary target sequence protects the Au-nanoprobe against aggregation and the solution remains red; the absence of a complementary DNA target sequence to that of the Au-nanoprobe results in extensive aggregation and the solution turns blue due to the red-shift of the SPR band. Based on the UV/visible spectra obtained after salt addition, the ratio between the absorbance at 526 nm (contribution of the non-aggregated fraction of Au-nanoprobe) and absorbance at 600 nm (contribution from the aggregated

fraction of Au-nanoprobe) was calculated (Fig. 2A). A ratio of 1 may be considered as the point of equilibrium between non-aggregated and aggregated nanoprobe, hence the threshold to respectively discriminate between positive and negative samples. This way, it was possible to identify samples containing the target sequence.

Following calibration, the minimum amount of salt (MgCl_2) required for the aggregation of the Au-nanoprobe used in the calibration assay was impregnated in each well of the paper plate platform. The wax used for production of the paper microplate template retains the Au-nanoprobe solution and, because each well was impregnated with a probe specific concentration of salt, allows aggregation to occur. Paper-based microplates are well suited for work with small volumes of sample: 5 μL of solution is sufficient to uniformly fill a well in the 384 microplate standard format, while a plastic plate requires a minimum of 15 μL to fill the bottom of the well. This approach gives accurate results when detecting MTBC members, uses small volumes of sample (5 μL), allowing for a reduction of 6 times the total amount of probe and sample. After sample hybridisation with Au-nanoprobe, the 5 μL reaction volume was added to the paper microplate platform for colour development. After 45 min for solvent evaporation and colour development, a plate image was captured with a smartphone and the ratio between the red RGB channel and the blue RGB channel calculated—Fig. 2B and 2C (see also the ESI†).

The colorimetric data was then recorded with a smartphone and analysed directly on the device without further manipulation or was analysed after sending the information via 3G to a laptop for imaging processing (Fig. 2). The same samples were also evaluated in the traditional microplate reader setup. For all methodologies, the Au-nanoprobe system was capable of specific identification of *M. tuberculosis* DNA ($p < 0.0001$) with little variability between the methods and no loss of sensitivity and specificity when performing the colour analysis directly on the mobile device (see the ESI†).

The Au-nanoprobe assay is capable of discriminating the presence of the MTBC sample DNA down to a concentration of 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (i.e. 41 and 246 pmol of target for *Gold on Paper* and a microplate reader, respectively). The *Gold on Paper* platform shows a response to increasing sample DNA concentration similar to that of the microplate reader. However, the difference between positive and negative is less intense, although clearly statistically significant (see the ESI†).

Paper is a good medium for colour based spot tests as it provides a strong contrast and, due to the high surface-to-volume ratio, facilitates the accelerated evaporation of solutions and results in concentrated analytes. As can be seen in Fig. 2, the microplate signal is more intense than that of the *Gold on paper* platform. This can be easily explained since a smaller amount of Au-nanoprobe is being used. In fact, the 5 μL reaction volume (versus 30 μL on the microplate reader) allows for complete and uniform coverage of the entire test zone with sharp colour change, enabling direct visual detection. This slight decrease in signal is greatly compensated by the simplicity of the detection without loss of sensitivity, and does not require a microplate reader or UV/vis spectrophotometer.

Smartphone devices eliminate the need to transmit data to achieve the result, allowing a fast and reliable analysis. Effective

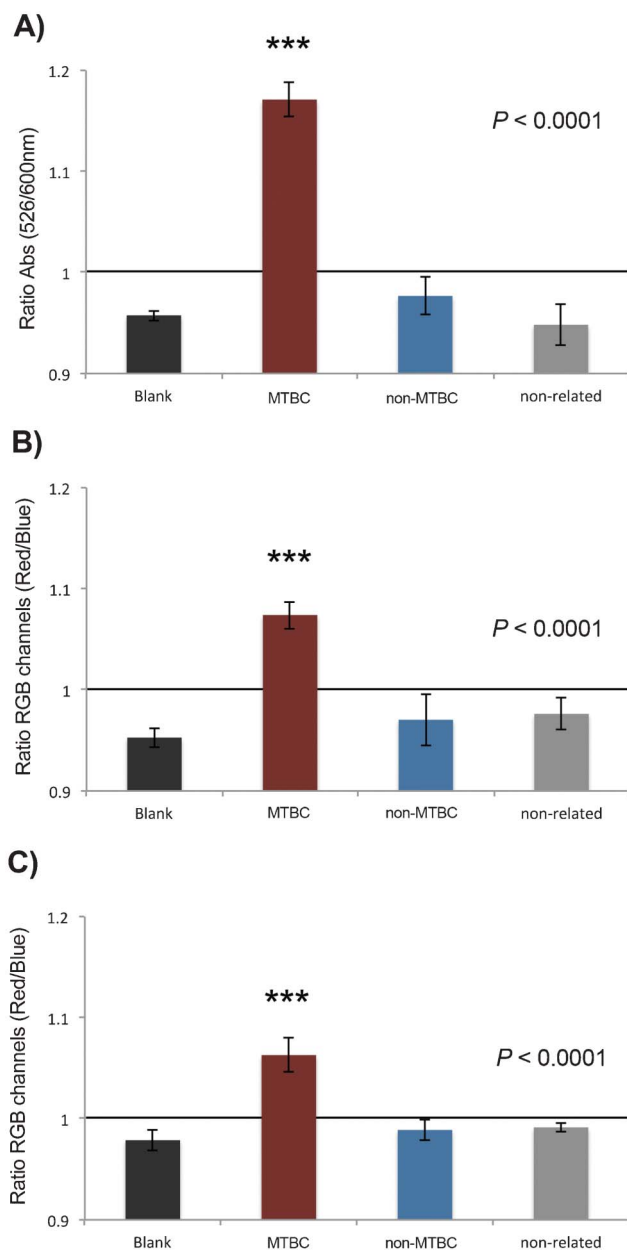


Fig. 2 Au-nanoprobe assay for MTBC detection: (A) MTBC standard assay performed in a microplate reader. Nanoprobe aggregation as measured by the ratio of aggregation (ratio of SPR intensity at 526 and 600 nm) for the assay mixtures—2.5 nM Au-nanoprobe, 10 mM phosphate buffer (pH 8), 0.1 M NaCl, and specific PCR amplified DNA at a final concentration of $30 \mu\text{g ml}^{-1}$ in a final volume of $30 \mu\text{L}$. Sample detection, after 30 min incubation with $[\text{MgCl}_2] = 0.02 \text{ M}$; (B) MTBC assay performed in the paper microplate, Nanoprobe aggregation as measured by image RGB analysis. Ratio of aggregation calculated in ImageJ™ on a PC (ratio of average intensity of the red and blue channels) for the assay mixtures. (C) MTBC assay performed in the paper microplate, nanoprobe aggregation as measured by image RGB analysis. Ratio of aggregation calculated in the smartphone (ratio of average intensity of the red and blue channels) for the assay mixtures. Paper microplate assay performed with—2.5 nM Au-nanoprobe, 10 mM phosphate buffer (pH 8), 0.1 M NaCl, and sample DNA at a final concentration of $30 \mu\text{g ml}^{-1}$ in a final volume of $5 \mu\text{L}$ per test. Image captured after 45 min. The bars represent the average of three independent measurements and the error bars indicate standard

deviation. The horizontal line represents the threshold of 1 considered for discrimination between positive and negative. Statistical analysis was performed using Prism 5 Graph Pad, using one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test; *** = $p < 0.0001$, $n = 3$.

TB diagnostics are achieved using *Gold on Paper* coupled to a mobile device and operational remote assessment is possible via RGB scrutiny.

After colour development three samples (paper microplate, MTBC positive and MTBC negative) were characterised via scanning electron microscopy (SEM) (Fig. 3). Results show a clear difference in the Au-nanoprobe dispersion in the presence of MTBC and non-MTBC target samples, the latter showing extensive Au-nanoprobe aggregation on the paper fibres. As shown above, these results show direct correlation with the colour captured in the digitalised images.

4 Conclusions

Serious efforts have been directed to provide robust, yet simple and portable molecular diagnostic platforms for use at peripheral laboratories and/or point-of-need. This is particularly relevant when assembling diagnostics platforms for worldwide epidemics with high numbers of affected people in less equipped regions of the globe, as in the case of tuberculosis. Here we show the potential of the *Gold on Paper* platform for TB molecular diagnostics that could be proven as a useful tool in the fight against TB. *Gold on Paper* is the working concept of integrating a paper microwell platform and a biomolecular detection scheme based on Au-nanoprobes. *Gold on Paper* was shown to be capable of efficiently detecting MTBC members directly and, by means of a smartphone device, analysing data on the spot while maintaining sensitivity and specificity. We have demonstrated that *Gold on Paper* detection is easy to perform without the need for expensive and complex laboratory set ups. Using *Gold on Paper*, it is possible to attain a positive identification of the pathogen within one hour, which via the use of a generic “smart” mobile device allows for complete analysis at a peripheral laboratory. We demonstrate that smartphones can be used as tools for data acquisition and handling in paper-based bioassays, eliminating the need to transmit data to get the results. Ultimately, we envisage a software package that collects and analyses the results on-site, and transmits the collected data to a centralised infrastructure. One issue hindering full implementation into remote locations may be the need for DNA sample preparation that now relies on PCR amplification, which is time consuming and costly. Nevertheless, efforts are being made to optimise this system via the removal of this limiting step. The limitation imposed by the DNA sample preparation is greatly overcome by the potential use of this methodology to identify and characterise the molecular signatures involved in antibiotic resistance.²² This way, the additional level of information will be of most value to implement and/or adjust therapy. The whole process, including the PCR amplification step, occurs under 2h30, which is considerably faster than traditional methods.

Before *Gold on Paper* can be translated into clinics and to the point-of-need, extensive validation is still required. Also, the PCR step ought to be removed and/or modified without loss of

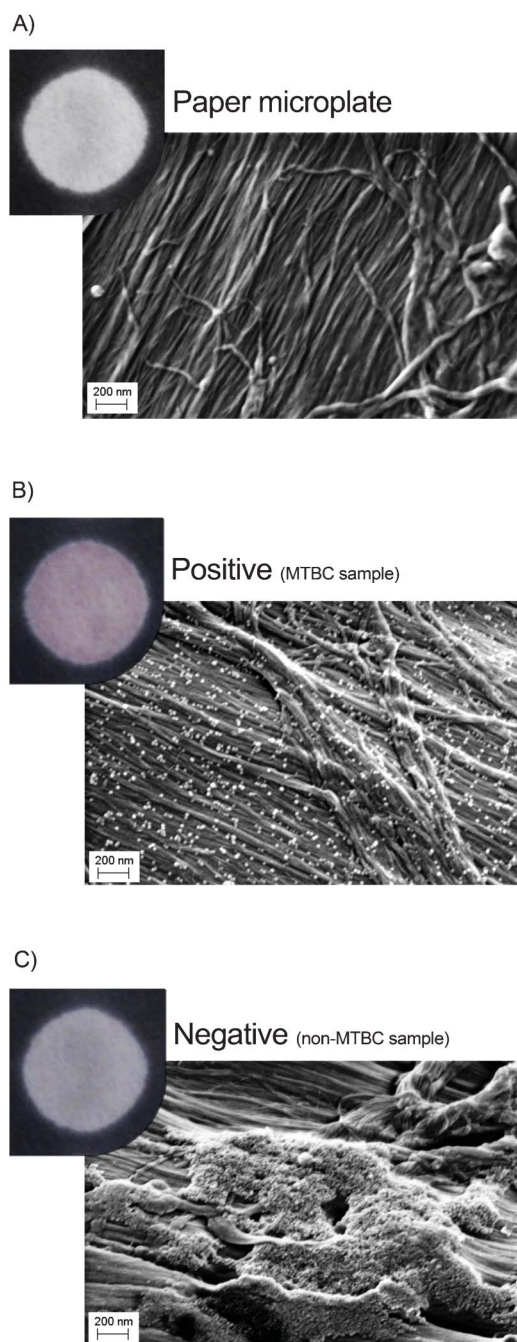


Fig. 3 Gold on Paper molecular diagnostics. Photographic captures of the detection on each well together with SEM images after the detection procedure. (A) Standard paper microplate well; (B) identification of a positive sample for *M. tuberculosis* complex (MTBC) showing the typical red colour on the spot. SEM image showing non-aggregated Au-nanoprobes; (C) Negative sample (non-MTBC DNA). SEM shows the extent of Au-nanoprobe aggregation on paper.

sensitivity, for example by including a paper microfluidics system for sample preparation.

Also, because we used paper as the platform for spotting and development of the aggregation assay, using SEM analysis it was possible to provide additional evidence of the differential aggregation events taking place in solution. For the first time,

irrefutable evidence of the mechanism underlying the target-mediated aggregation of Au-nanoprobes *via* the non-cross-linking approach mechanism has been provided. In fact, the presence of the specific target prevents against salt induced aggregation and, as result, the solution retains the original colour; conversely, aggregation of the Au-nanoprobes upon salt addition occurs because no target is present to hybridise to the nanoprobe and hamper aggregation.

Based on *Gold on Paper* it is possible to perform the biorecognition and detection event and transmit digital information over existing communication channels, combined with geolocation metadata inserted into the captured digital images. This integrated diagnostics scheme can then forward the attained data to a centralised off-site server allowing for monitoring of TB in real-time that could be proven to be extremely useful in remote areas of the globe lacking resources. Future studies will be carried out to optimise the methodology towards validation, direct application to clinical samples, and to extend the range of applications to mutations associated with drug resistance.

Acknowledgements

This work was partially supported by the European Commission under project INVISIBLE (FP7 ERC grant n° 228144), and FCT/MEC: Strategic Projects PEst-C/CTM/LA0025/2011 and PEst-OE/SAU/UI0009/2011; Projects PTDC/EEA-ELC/099490/2008 (paper@), PTDC/SAU-BEB/098125/2008 (BloodFET), PTDC/CTM/NAN/109877/2009, PTDC/CVT/111634/2009. B. Veigas was supported by FCT/MEC (SFRH/BD/78970/2011).

References

- 1 World Health Organization (WHO), *Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing*, WHO, Geneva, Switzerland, 2011, ISBN 978 92 4 156438 0.
- 2 M. Barnard, H. Albert, G. Coetzee, R. O'Brien and M. E. Bosman, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2008, **177**, 787–792.
- 3 H. De Beenhouwer, Z. Lhiang, G. Jannes, W. Mijs, L. Machtelinckx, R. Rossau, H. Traore and F. Portaels, *Tubercle Lung Dis.*, 1995, **76**, 425–430.
- 4 M. Viveiros, M. Martins, I. Couto, L. Rodrigues, D. Machado, I. Portugal and L. Amaral, *Expert Rev. Anticancer Ther.*, 2010, **8**, 465–480.
- 5 D. Hillemann, M. Weizenegger, T. Kubica, E. Richter and S. Niemann, *J. Clin. Microbiol.*, 2005, **43**, 3699–3703.
- 6 W. G. Park, W. R. Bishai, R. E. Chaisson and S. E. Dorman, *J. Clin. Microbiol.*, 2002, **40**, 4750–4752.
- 7 S. Su, R. Nutiu, C. D. Filipe, Y. Li and R. Pelton, *Langmuir*, 2007, **23**, 1300–1302.
- 8 R. Tanaka, T. Yuhi, N. Nagatani, T. Endo, K. Kerman, Y. Takamura and E. Tamiya, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2006, **385**, 1414–1420.
- 9 A. Y. Kolosova, L. Sibanda, F. Dumoulin, J. Lewis, E. Duveiller, C. Van Peteghem and S. De Saeger, *Anal. Chim. Acta*, 2008, **616**, 235–244.
- 10 D. A. Bruzewicz, M. Reches and G. M. Whitesides, *Anal. Chem.*, 2008, **80**, 3387–3392.
- 11 A. W. Martinez, S. T. Phillips, E. Carrilho, S. W. Thomas III, H. Sindi and G. M. Whitesides, *Anal. Chem.*, 2008, **80**, 3699–3707.
- 12 E. Carrilho, S. T. Phillips, S. J. Vella, A. W. Martinez and G. M. Whitesides, *Anal. Chem.*, 2009, **81**, 5990–5998.
- 13 E. Carrilho, A. W. Martinez and G. M. Whitesides, *Anal. Chem.*, 2009, **81**, 7091–7095.
- 14 Y. H. Ngo, D. Li, G. P. Simon and G. Garnier, *Langmuir*, 2012, **28**, 8783–8790.
- 15 W. Zhao, M. M. Ali, S. D. Aguirre, M. A. Brook and Y. Li, *Anal. Chem.*, 2008, **80**, 8431–8437.
- 16 H. M. E. Azzazy, M. M. H. Mansour and S. C. Kazmierczak, *Clin. Chem.*, 2006, **52**, 1238–1246.

- 17 M. Das, G. Sumana, R. Nagarajan and B. D. Malhotra, *Thin Solid Films*, 2010, **519**, 1196–1201.
- 18 K. K. Jain, *Clin. Chem.*, 2007, **53**, 2002–2009.
- 19 H. M. E. Azzazy and M. M. H. Mansour, *Clin. Chim. Acta*, 2009, **403**, 1–8.
- 20 P. V. Baptista, M. Koziol-Montewka, J. Paluch-Oles, G. Doria and R. Franco, *Clin. Chem.*, 2006, **52**, 1433–1434.
- 21 B. Veigas, G. Doria and P. V. Baptista, in *Nanodiagnosics for Tuberculosis, Understanding Tuberculosis-Global Experiences and Innovative Approaches to the Diagnosis*, ed. Dr Pere-Joan Cardona, InTech, 2012, ch. 12, pp. 257–276.
- 22 B. Veigas, D. Machado, J. Perdigão, I. Portugal, I. Couto, M. Viveiros and P. V. Baptista, *Nanotechnology*, 2010, **21**, 5101–5108.
- 23 G. Doria, J. Conde, B. Veigas, L. Giestas, C. Almeida, M. Assunção, J. Rosa and P. V. Baptista, *Sensors*, 2012, **12**, 1657–1687.
- 24 L. B. Silva, B. Veigas, G. Doria, P. Costa, J. Inácio, R. Martins, E. Fortunato and P. V. Baptista, *Biosens. Bioelectron.*, 2011, **26**, 2012–2017.
- 25 P. C. Soo, Y. T. Horng, K. C. Chang, J. Y. Wang, P. R. Hsueh, C. Y. Chuang, C. C. Lu and H. C. Lai, *Mol. Cell. Probes*, 2009, **23**, 240–246.
- 26 P. C. Lee and D. Meisel, *J. Phys. Chem.*, 1982, **86**, 3391–3395.
- 27 J. J. Storhoff, R. Elghanian, R. C. Mucic, C. A. Mirkin and R. L. Letsinger, *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, **120**, 1959–64.
- 28 P. V. Baptista, G. Doria, D. Henriques, E. Pereira and R. Franco, *J. Biotechnol.*, 2005, **119**, 111–117.